
Identifizierung neuer Zielstrukturen für eine Immuntherapie von Sarkomen und weiteren Tumoren

Michaela Carina Baldauf



München 2021

Aus dem Pathologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

Identifizierung neuer Zielstrukturen für eine Immuntherapie von Sarkomen und weiteren Tumoren

Michaela Carina Baldauf

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michaela Carina Baldauf
aus Lindenberg i. Allgäu

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Thomas Grünewald

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Dominik Rüttinger

Prof. Dr. Stefan Endres

Prof. Dr. Marion Subklewe

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

22.04.2021

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die Ursprünge der Immuntherapie	1
1.2	Klassifizierung von Tumorantigenen	3
1.3	Immuntherapeutische Ansatzpunkte und ihre Anwendung	3
1.3.1	Unspezifische passive Immuntherapie	3
1.3.2	Unspezifische aktive Immuntherapie	5
1.3.3	Spezifische passive Immuntherapie	5
1.3.3.1	Antikörper-basierte Therapien	5
1.3.3.1.1	Chimärer Antigen-Rezeptor (CAR)	5
1.3.3.1.2	Tyrosinkinase-Inhibitoren	6
1.3.3.1.3	Antikörper-Wirkstoff-Konjugate	6
1.3.3.2	Adoptive transgene T-Zell-Therapie	6
1.3.4	Spezifische aktive Immuntherapie	7
1.3.4.1	Impfstoffe zur Therapie von Tumoren	7
1.3.4.2	Impfstoffe zur Prävention von Tumoren	8
2	Zielsetzung	9
3	Material und Methoden	11
3.1	Material	11
3.1.1	Microarray Expressionsdaten	11
3.1.2	Chip Description Datei (CDF)	16
3.1.3	Humane Zelllinien und Zellkultur	16
3.1.4	RNA-Extraktion und qRT-PCR	18
3.1.5	Konstruktion von Gewebe-Microarrays (TMAs)	19
3.1.6	Antikörper	20
3.1.6.1	Antikörper für Immunhistochemie (IHC)	20
3.1.6.2	Antikörper für Immunfluoreszenz	21
3.1.7	Peptide	21
3.1.8	Ethik-Genehmigung für humane Proben	23
3.2	Methoden	23
3.2.1	Qualitätskontrolle der Microarrays	23
3.2.2	Erstellen der Expressionstabelle mit RMAExpress	25

3.2.3	Identifikation von tumorspezifischen Genen - CSG-Scores	25
3.2.4	Zellkultur	26
3.2.5	RNA-Extraktion, reverse Transkription und qRT-PCR	26
3.2.6	Immunhistochemie (IHC)	26
3.2.7	Evaluation der Immunoreaktivität	27
3.2.8	Prädiktionsalgorithmen hochaffiner Peptide	28
3.2.9	Proteinblast	28
3.2.10	Peptidbindungsversuch mit TAP-defizienten T2-Zellen	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Übersicht über den Projektablauf	32
4.2	Eingeschlossene Microarrays	33
4.3	Identifizierung und Validierung überexprimierter CSGs	33
4.3.1	Bioinformatische Identifikation von CSGs	34
4.3.2	Validierung der spezifischen Überexpression von CSGs mit qRT-PCR	34
4.3.3	Validierung der spezifischen Überexpression des CSGs PAX7 auf Pro- teinebene mit IHC	37
4.4	Identifizierung CSG-spezifischer Peptide mit hoher MHC-Affinität	38
4.4.1	Bioinformatische Vorhersage hochaffiner CSG-spezifischer Peptide .	38
4.4.2	In-vitro-Validierung der prädizierten hohen MHC-Affinität	39
4.5	RAVEN	46
5	Diskussion	47
5.1	Diskussion der Resultate	47
5.2	Limitationen und Perspektiven	49
6	Zusammenfassung	53
	Abkürzungsverzeichnis	55
	Abbildungsverzeichnis	56
	Tabellenverzeichnis	58
	Literaturverzeichnis	60
	Danksagung	74
	Eidesstattliche Versicherung	77

1. EINLEITUNG

1.1 Die Ursprünge der Immuntherapie

Die Ausnutzung des Immunsystems zur Bekämpfung von Krankheiten nimmt ihren Ursprung in der Bekämpfung infektiöser Erkrankungen mithilfe von Impfungen. So war die erste bekannte Impfung eine Pockenimpfung. Diese wurde in China schon vor Christi Geburt [1, 2] mit Variola minor durchgeführt, worunter nur 1-2% der Patienten schwere Infektionen entwickelten, im Gegensatz zu 30% mit schweren Infektionen bei einer Infektion mit Variola major. Im 18. Jahrhundert fand dies auch den Weg nach England, wo sich später im selben Jahrhundert die ersten Berichte über eine Pockenimpfung mittels Kuhpocken fanden [2].

Im späten 19. und im 20. Jahrhundert entstanden schließlich weitere Impfstoffe, zum Beispiel 1885 gegen Tollwut, 1917 gegen Cholera und Typhus, und in den folgenden einhundert Jahren auch gegen Diphtherie, Keuchhusten, Tuberkulose, Tetanus, Gelbfieber, Influenza, Poliomyelitis, Masern, Mumps, Röteln, Meningokokken, Hepatitis B, Pneumokokken, Hämophilus influenzae B, Rotaviren, Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Hepatitis A, Japanische Enzephalitis, Dengue, Typhus, Varizella zoster Virus (VZV) und Humane Papilloma Viren (HPV) [3]. Die Tuberkulose-Impfung mit BCG wird in Deutschland seit 1998 nicht mehr empfohlen [4].

Die erste erfolgreiche Passivimpfung wurde 1891 verabreicht. Es handelte sich um Antikörper als Diphtherie-Antitoxin [5].

Die heutige Idee, mit Impfungen oder anderen Immuntherapien auch Malignome zu therapieren, hatte William Coley schon im 19. Jahrhundert. Er stellte fest, dass es mehrere Berichte über Tumorpatienten gab, bei denen eine Infektion zu einer Remission des begleitenden Tumorleidens geführt hatte. Er verabreichte daraufhin mehreren Tumorpatienten Streptococcus pyogenes, klassische Erreger eines Erysipels. Da es hierunter zu zwei Todesfällen aufgrund einer Sepsis kam, verabreichte er fortan ein hitze-inaktiviertes Gemisch aus Streptococcus pyogenes und Serratia marcescens, auch "Coley's Toxin" genannt, worunter er dauerhafte Heilungserfolge beobachten konnte. Da man sich dies jedoch noch nicht erklären konnte, sollte es bis zur weiteren Entwicklung von Immuntherapien noch einige Zeit dauern. Wegweisend waren unter anderem 1957 die Entdeckung von Interferon [6, 7, 2], 1967 die Beschreibung von T-Zellen und ihrer Funktion [8, 2], 1973 die Beschreibung von dendritischen Zellen [9, 2], die Entdeckung von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Restriktion 1974 [10, 2] und von natürlichen Killerzellen (NK) 1975 [11, 12, 2].



Abbildung 1.1: Der Chirurg William Coley. Abbildung freundlicherweise vom Cancer Research Institute zur Verfügung gestellt[13]

MAGEA1 wurde als Antigen auf verschiedenen Melanom-Zelllinien entdeckt, während es jedoch nicht auf normalen Zellen zu finden war. 1991 wurde es als erstes humanes Tumorantigen geklont, nachfolgend auch verschiedene andere Neoantigene und überexprimierte normale Antigene [14, 15]. In Melanompatienten wurden gegen MAGEA1 gerichtete zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) gefunden, die die Melanomzellen in Zelllinien anderer Patienten spezifisch erkannten [15].

1998 und 2001 wurde der Nachweis von gegen Tumorzellen gerichteten Immunantworten sowie von immunsuppressiven Mechanismen von Tumorzellen zur Umgehung des Immunsystems erbracht [16, 17, 2]. So sind viele Tumorgewebe reich an immunsuppressiv wirkenden Zellen, z.B. regulatorische T-Zellen (Treg) [18, 2], deren Anzahl mit schlechteren Prognosen korreliert [19, 20, 21, 2].

1.2 Klassifizierung von Tumorantigenen

Tumorantigene können in drei Gruppen klassifiziert werden. Einmal sind das Neoantigene. Sie entstehen durch Mutationen, die eine veränderte Aminosäuresequenz des Genprodukts zur Folge haben [14].

Dann gibt es sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA). Hierbei handelt es sich um überexprimierte normale Proteine. Die Antigenität dieser körpereigenen Proteine beruht auf der abnormen Überexpression, oft sind die Affinitäten der T-Zell-Rezeptoren (TCR) gegen solche tumorassoziierten Gene jedoch niedriger als gegen körperfremde Proteine [14, 22, 23, 24].

Die letzte Gruppe bilden Cancer-testis Antigene. Dies sind Antigene, die für gewöhnlich ausschließlich im Keimgewebe exprimiert werden [14, 25]. Da diese in reifen Geweben entweder gar nicht mehr exprimiert werden oder nur noch im Hoden-Gewebe, welches immunprivilegiert ist, sind die Cancer-testis-Antigene ebenfalls eine vielversprechende Zielgruppe für immuntherapeutische Ansätze.

In dieser Arbeit wird Ihnen später der Begriff tumorspezifische Gene (CSG = cancer specific gene, englisch für tumorspezifisches Gen) begegnen. Dieser beschreibt alle im Tumor im Vergleich zu reifen Normalgeweben überexprimierten Gene und beinhaltet damit sowohl die TAAs als auch die Cancer-testis Antigene.

1.3 Immuntherapeutische Ansatzpunkte und ihre Anwendung

Mittlerweile gibt es sehr vielfältige Ansatzpunkte, an denen Immuntherapien in das Immunsystem und dessen Interaktion mit dem Tumorgewebe eingreifen. Diese sollen im Folgenden systematisch dargestellt werden. Eine mögliche Einteilung unterscheidet hier in passive und aktive Immuntherapien analog zur herkömmlichen Bezeichnung bei Impfungen: bei aktiven Formen muss das Immunsystem auf einen dargebotenen Reiz reagieren, bei passiven Formen werden bereits fertige Antikörper oder Zellen zur Tumorelimination verabreicht [5].

1.3.1 Unspezifische passive Immuntherapie

Oftmals entwickeln Tumore Strategien, um der Bekämpfung durch das Immunsystem zu entkommen. Diese Mechanismen zu umgehen ist ein wichtiger Ansatzpunkt von Immuntherapien. So soll das eigene Immunsystem Tumorzellen wieder besser erkennen und eliminieren können bzw. andere Formen der Immuntherapie wie adoptive T-Zell-Therapien in ihrer Wirkung verbessert werden.

Eine grosse Gruppe bilden hier die sogenannten Checkpoint-Inhibitoren. Das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4) hemmt Signalwege der Aktivierung von T-Zellen [26, 27] und nimmt damit eine Funktion als Immuncheckpoint ein. Schon 1995 wurde diese

Funktion erkannt [28, 2]. Mittlerweile ist nun ein CTLA-4-Inhibitor für fortgeschrittene Melanome zugelassen. Hierbei handelt es sich um Ipilimumab, einen IgG-Antikörper, mit dem das Überleben von Patienten mit metastasierten Melanomen signifikant verlängert werden konnte [27, 2].

Ein weiterer Immuncheckpoint ist der programmed death 1 (PD-1) Rezeptor, der von T-Zellen exprimiert wird. Er wird aktiviert durch die Liganden PD-L1, unter anderem exprimiert durch Tumorzellen, und PD-L2, exprimiert durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs). PD-1 hemmt dann die Funktion der entsprechenden T-Zelle [6, 29, 30]. Um die Bindung zwischen PD-1 und seiner Liganden zu verhindern, wurden spezifische Antikörper gegen PD-1 entwickelt. Ein Beispiel hierfür ist Lambolizumab, ein IgG-Antikörper, der in einer Studie zu einem andauernden Therapieansprechen bei fortgeschrittenen Melanomen führte [6]. Ein weiterer bei verschiedenen Tumorarten untersuchter anti-PD-1-Antikörper ist Nivolumab (BMS-936558), unter dem sich bei 28% der Patienten mit fortgeschrittenem Melanom ein Ansprechen zeigte [31]. Auch gegen den Liganden PD-L1 wurden Antikörper entwickelt und getestet. So zeigte der anti-PD-L1-IgG-Antikörper BMS-936559 in einer Phase-I-Studie ein Therapieansprechen in 6-17% der Fälle je nach untersuchter Tumorart. Die 17% wurden bei Melanomen erreicht. Bei der Hälfte aller Patienten mit Therapieansprechen zeigte sich nach 12 Monaten eine andauernde Partial- oder Totalremission [30].

Außerdem existieren Antikörper gegen die Immuncheckpoints TIM-3 und LAG-3 [32]. Eine weitere Möglichkeit ist die Stimulation von Molekülen, die das Immunsystem aktivieren, beispielsweise von CD27, CD40, GITR oder CD137 [32].

Zum Zeitpunkt Februar 2019 waren in der Europäischen Union für verschiedene Indikationen insgesamt fünf Checkpoint-Inhibitoren zugelassen [32]. Dabei handelt es sich um Ipilimumab gegen CTLA-4 beim Melanom, die PD-1-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab bei mehreren Tumorarten inklusive Melanom, NSCLC, klassisches Hodgkin-Lymphom und Urothelkarzinom und bei Nivolumab weitere Tumoren sowie zwei anti-PD-L1-Antikörper, Avelumab bei Merkelzellkarzinomen und Atezolizumab bei NSCLC und Urothelkarzinomen [32].

Um der immunsuppressiven Wirkung von Tumoren entgegenzuwirken, gibt es auch Ansätze, lösliche Zytokine oder andere das Immunsystem unterdrückende Faktoren zu antagonisieren. Dabei finden verschiedene Antikörper, die in der Rheumatologie schon erprobt sind, Anwendung. Hierzu zählen insbesondere TNFalpha-Blocker wie Infliximab, IL1-Rezeptor-Antagonisten wie Anakinra, IL2-Rezeptor-Antagonisten wie Daclizumab und IL-4/IL-13-Rezeptor-Antagonisten wie Lebrikizumab [2].

Auch manche Tyrosinkinase-Inhibitoren zählen zur Immuntherapie. So sind die Multikinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafenib in der Lage, die regulatorischen T-Zellen im Mausmodell und in Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom zu reduzieren und dadurch die antitumorale Immunantwort zu stimulieren. Für Sorafenib ist diese Wirkung auch beim hepatozellulären Karzinom beschrieben. Über welche Mechanismen diese zwei Wirkstoffe die T-Zell-Zusammensetzung im Tumorgewebe verändern, ist aktuell noch nicht gut verstanden [33, 2].

1.3.2 Unspezifische aktive Immuntherapie

Historisch fand hier unter anderem Coley's Toxin Anwendung, wie oben beschrieben. Heute findet eine immunmodulatorische Therapie mit attenuierten *Bacillus-Calmette-Guerin* (BCG) Mykobakterien Anwendung in der Therapie und Rezidivprophylaxe von oberflächlichen Blasenkarzinomen. Die BCG-Bakterien werden hierfür mehrfach in die Blase instilliert und führen zu einer Immunmodulation mit Ausschüttung von Zytokinen. Zum anderen scheinen Urothelkarzinom-Zellen und Makrophagen BCG aufzunehmen und anschließend BCG-Partikel an ihrer Oberfläche zu präsentieren, was zur T-Zell-Aktivierung und in der Folge zur Beseitigung der Tumorzellen führen soll [34, 35]. Auch die Verwendung anderer (attenuierter) Bakterien wie *Salmonella enterica* zur antitumoralen Immuntherapie ist aktuell Gegenstand der Forschung [36].

1.3.3 Spezifische passive Immuntherapie

1.3.3.1 Antikörper-basierte Therapien

Hier werden verschiedene immuntherapeutische Möglichkeiten dargestellt, die alle auf Antikörpern gegen spezifische Antigene der Tumorzellen basieren.

1.3.3.1.1 Chimärer Antigen-Rezeptor (CAR) Die Anwendung von CAR-T-Zellen wurde erstmals 1993 experimentell beschrieben [37, 2]. Bei CAR Therapien wird ein Antikörper, der spezifisch gegen ein Antigen auf der Tumorzelloberfläche gerichtet ist, genetisch an patienteneigene T-Zellen gekoppelt. Dies ist schematisch in Abbildung 1.2 abgebildet. So kann die T-Zelle Tumorzellen erkennen, ohne dass eine Bindung zwischen dem TCR und den MHC-Molekülen der Tumorzelloberfläche nötig ist. Einige Tumorarten präsentieren weniger MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche, um so einer Erkennung und Elimination durch das Immunsystem zu entkommen. Gerade in solchen Fällen ist eine CAR Therapie von großem Vorteil [38]. Zudem können aus diesen CAR-T-Zellen auch Gedächtniszellen entstehen, sodass eine dauerhafte Heilung erreicht werden kann [38]. Klinisch konnten so schon einige Patienten erfolgreich therapiert werden [39, 40, 41, 2]. Ein Beispiel ist die Anwendung von CAR-T-Zellen gegen CD19, welches auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert ist, zur Bekämpfung von akuter lymphatischer Leukämie der B-Zellen (B-ALL). Dabei ließen sich in bisherigen Studien komplette Remissionen bei bis zu 90% der untersuchten Patienten erreichen [42, 43, 38]. Seit 2018 sind in Europa zwei verschiedene anti-CD19-CAR-Therapien für verschiedene Malignome der B-Zell-Reihe zugelassen [44]. Insbesondere bei soliden Tumoren stößt die CAR-Therapie bisher noch an ihre Grenzen, da diese oft sehr heterogen sind, was die Auswahl einer Zielstruktur, die auf möglichst allen Tumorzellen exprimiert sein sollte, erschwert [38]. Gegenstand der aktuellen Forschung ist hier unter anderem die Kombination von CARs gegen mehrere Zielstrukturen, um heterogenen Tumoren entgegenzutreten zu können [38]. Eine weitere Möglichkeit ist, CAR-T-Zellen gegen Zellen des Tumormikromilieus wie zum Beispiel gegen Fibroblasten anzuwenden [45, 38].

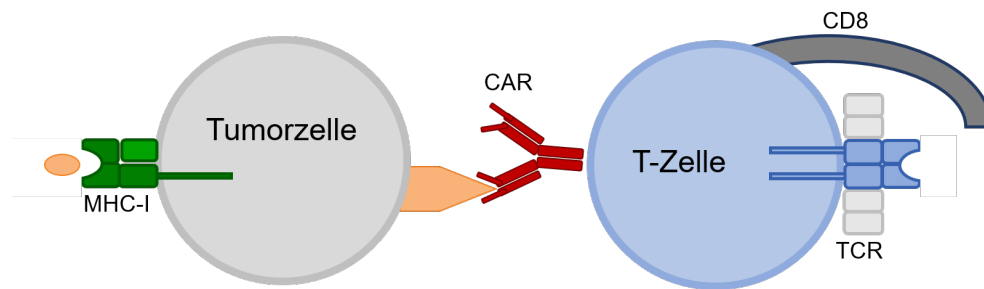


Abbildung 1.2: CAR-Therapie

1.3.3.1.2 Tyrosinkinase-Inhibitoren Ein Beispiel sind Wachstumsfaktor-Inhibitoren. Der Antikörper Trastuzumab, der sich gegen den Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2 an der Zelloberfläche richtet, hemmt zum einen den weiteren Signalweg und wirkt dadurch anti-proliferativ auf Her2 überexprimierende Tumorzellen. Zum anderen lockt die Antikörper-Markierung der Tumorzellen durch Trastuzumab CTLs an, die die Tumorzellen eliminieren können [5].

1.3.3.1.3 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate Zudem gibt es die Möglichkeit, Toxine an Antikörper zu koppeln, sogenannte Antikörper-Wirkstoff-Konjugate. Sobald der Antikörper an die Zieltumorzelle bindet, werden die Toxine am Tumorgewebe freigesetzt. Sie können dadurch lokaler und mit weniger systemischen Nebenwirkungen wirken [5].

Ein Beispiel hierfür ist T-DM1. T-DM1 besteht aus Trastuzumab mit daran gekoppeltem DM1, ein potenter Mitoseinhibitor, und wird bei Her2-positivem Brustkrebs angewendet [46, 47]. In einer Phase-III-Studie fand sich unter einer Therapie mit T-DM1 eine signifikante Verlängerung des Überlebens bei gleichzeitig weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu einer Therapie mit Capecitabin mit Lapatinib [46].

Ein weiteres Beispiel sei mit Brentuximab genannt. Es setzt sich aus einem anti-CD30-Antikörper mit Monomethyl-Auristatin zusammen und findet bei der Therapie von Hodgkin-Lymphomen und anaplastischen großzelligen Lymphomen Anwendung [48]. Bei therapieresistenten Hodgkin-Lymphomen nach Stammzelltransplantation konnte eine Therapie mit Brentuximab nicht nur das Überleben verlängern, bei etwa einem Drittel konnte es sogar eine Komplettremission erreichen [48, 47].

1.3.3.2 Adoptive transgene T-Zell-Therapie

Eine weitere vielversprechende Möglichkeit ist die adoptive T-Zell-Therapie. Hier erhält der Patient seine eigenen T-Zellen, in die ein spezifisch gegen ein Peptid der Tumorzellen gerichteter TCR geklont wurde, zurücktransfundierte. Wenn diese T-Zellen einen Peptid-MHC-Komplex erkennen und binden, führt dies zu ihrer Aktivierung und zur Beseitigung der Tumorzelle.

Im Gegensatz zur CAR-Therapie, die sich nur gegen Moleküle an der Zelloberfläche richtet, können TCR transgene T-Zellen gegen verschiedene auf MHC-Molekülen präsentierte

Peptide gerichtet sein, die auch einem Protein im Zellinneren entstammen können. Bei der adoptiven T-Zell-Therapie ist jedoch die spezifische Interaktion mit MHC-Molekülen nötig, die bei der CAR-Therapie entfällt. Dies ist in Abbildung 1.3 skizziert. T-Zellen können zudem ein Langzeit-Gedächtnis gegen Tumorzellen ausbilden, sodass die Hoffnung auf ein dauerhaftes Therapieansprechen besteht [14]. Die Bestimmung von spezifischen Peptiden als Zielstrukturen ist sehr wichtig, da es sonst zu Kreuzreaktionen kommen kann. Es gibt auch Ansätze der Affinitätssteigerung von TCR. Hierbei steigt jedoch die Gefahr einer Kreuzreaktion [49], das Risiko schwerer Nebenwirkungen ist aktuell schwer vorhersehbar [50, 51].

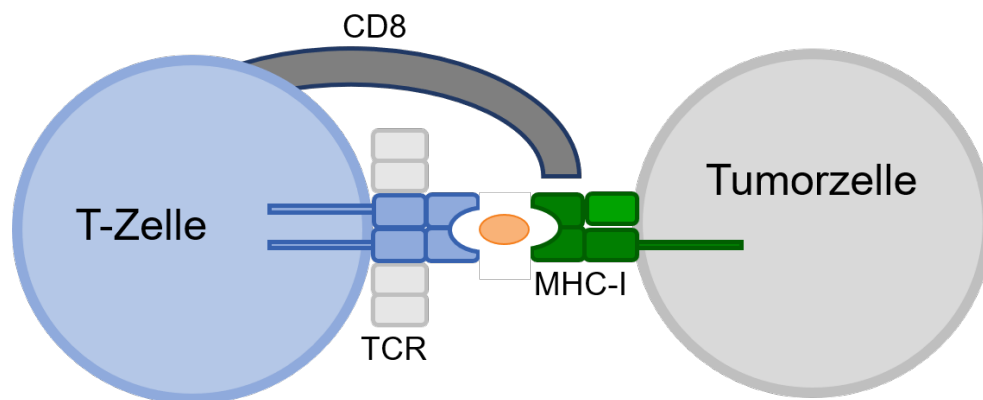


Abbildung 1.3: Adoptive T-Zell-Therapie

Nachfolgend seien einige Beispiele für die präklinische wie auch klinische Anwendung adoptiver T-Zell-Therapien bei oligomutierten Ewing-Sarkomen genannt. So konnten T-Zellen mit einem transgenen TCR gegen ein Peptid aus dem CSG PAPPa, ein im Ewing-Sarkom überexprimiertes Protein, das Tumorstadium von Ewing-Sarkomen im Mausmodell signifikant hemmen [49]. Auch gegen ein Peptid aus CHM1, ebenfalls im Ewing-Sarkom überexprimiert, wurden spezifische HLA-A02:01-restriktive T-Zellen generiert, die das Wachstum von Ewing-Sarkom Metastasen im Mausmodell signifikant verringern konnten [52]. Spezifische gegen CHM1 gerichtete T-Zellen fanden auch bei drei therapierefraktären Patienten klinische Anwendung. Bei einem Patienten führte die Therapie zu einem teilweisen Rückgang der metastatischen Besiedelung des Knochenmarks, wo die T-Zellen noch nach mehreren Wochen nachweisbar waren. Keiner der Patienten zeigte Hinweise auf eine Graft versus Host Disease (GvHD) [53].

1.3.4 Spezifische aktive Immuntherapie

1.3.4.1 Impfstoffe zur Therapie von Tumoren

Auch die Verabreichung von Impfstoffen ist eine Möglichkeit der Immuntherapie. Sie sollen das Immunsystem für Antigene der Tumorzellen sensibilisieren und entsprechende spezifische Zellen des Immunsystems aktivieren. Aktuell finden solche therapeutischen Impfstoffe

insbesondere beim Prostatakarzinom Anwendung. Hier können organspezifische Antigene wie das Prostata-spezifische Antigen (PSA) oder die Prostataspezifische saure Phosphatase (PAP), die in keinem anderen Normalgewebe exprimiert werden, gut als spezifische Impfstoffe verwendet werden [54].

Ein Beispiel ist Sipuleucel-T. Dieser Impfstoff besteht aus einem Fusionprotein aus PAP und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), was die Immunzellen zusätzlich aktivieren soll [54]. APCs des Patienten werden hier ex vivo mit dem Fusionsprotein vorbehandelt und anschließend dem Patienten zurücktransfundierte. In Phase-III-Studien bei Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom ließ sich hier eine signifikante Verlängerung des Überlebens feststellen [54].

Ein anderes Beispiel ist GVAX PCa. Der Impfstoff besteht hier aus einer Mischung zweier inaktivierter GM-CSF-exprimierender Prostatakarzinom-Zelllinien, LNCaP und PC-3 [55, 54], und wurde in klinischen Studien ebenfalls bei Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom untersucht. Er wurde intradermal verabreicht und mit einer Radiotherapie kombiniert. In Phase-I/II-Studien zeigte sich eine signifikante Verlängerung des Überlebens bei der Kombination von GVAX PCa mit Hochdosis-Radiotherapie im Vergleich zu Radiotherapie allein [56, 54]. Allerdings mussten schon zwei Phase-III-Studien abgebrochen werden. Die Relevanz von GVAX PCa in Zukunft bleibt also abzuwarten [54].

1.3.4.2 Impfstoffe zur Prävention von Tumoren

Um den Formenkreis der Immuntherapien zu komplettieren, seien an dieser Stelle auch noch Impfungen zur Primärprävention von Tumoren erwähnt. Dazu zählt insbesondere die seit 2006 zugelassene Impfung gegen HPV, die eine Infektion der Schleimhaut mit HPV verhindern und so die Entwicklung von Zervixkarzinomen, Analkarzinomen und Karzinomen des Mundrachenraums verhindern bzw. deren Risiko verringern soll [5]. Hierzu sind in Deutschland mittlerweile drei Impfstoffe zugelassen, ein bi-, ein quadri- und ein nonavalenter Impfstoff.

Zudem schützt die Impfung gegen Hepatitis B (seit 1981) nicht nur gegen die Infektion per se, sondern senkt infolge dessen präventiv auch das Risiko der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen [5].

Eine Impfung gegen das Epstein-Barr-Virus (EBV) existiert bisher nicht für die klinische Anwendung, wird jedoch stark beforscht [57]. Sobald hierbei ein Impfstoff für die klinische Anwendung entsteht, könnte dieser auch vor den mit einer EBV-Infektion assoziierten Tumoren wie verschiedenen Lymphomen oder Kopf-Hals-Tumoren schützen.

2. ZIELSETZUNG

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, neue Zielstrukturen für spezifische Immuntherapien von verschiedenen Tumoren mit einem Fokus auf Sarkomen und pädiatrischen Tumoren zu finden.

Viele pädiatrische Tumore und Sarkome sprechen schlecht auf konventionelle Radiochemotherapien an und bringen zudem durch ihr unspezifisches Wirken viele oft schwere und dauerhafte Nebenwirkungen mit sich. Deshalb ist insbesondere für diese Tumorarten eine Immuntherapie mit adoptiven T-Zell-Therapien vielversprechend, da diese eine sehr zielgerichtete Bekämpfung ausschließlich der Tumorzellen ermöglichen [58]. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung spezifischer Zielstrukturen, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.

Sarkome und einige weitere pädiatrische Tumore sind oligomutiert [58, 59], sodass Neoantigene keinen geeigneten Angriffspunkt für T-Zell-basierte Immuntherapien bieten. Diese Studie soll daher Gene identifizieren, die in den Tumorzellen im Vergleich zu allen Normalgeweben stark überexprimiert werden, sogenannte CSGs. In der Folge suchen wir nach auf MHC-I präsentierten Peptiden, die durch CSGs kodiert werden und die durch ihre abnorm große Anzahl vom Immunsystem als Abweichung vom Normalzustand erkannt werden können. Oft werden solche überexprimierten CSGs nur in Keimgewebe wie Hodengewebe oder während der embryonalen Entwicklung exprimiert und sind auf normalen adulten Zellen nicht zu finden. Andere CSGs werden nur sehr schwach von normalen Zellen exprimiert und bieten durch die starke Überexpression auf den Tumorzellen ein großes therapeutisches Fenster.

Es existieren viele und sehr umfassende öffentlich zugängliche Daten zu den Transkriptomen verschiedener Tumorzellen und Normalgewebe [60]. Aufgrund fehlender Algorithmen und automatisierter Analysen kann das Potenzial dieser vorhandenen Daten bislang leider nicht voll ausgeschöpft werden. Im Gegenteil bleibt die Suche nach spezifischen Zielstrukturen für eine Immuntherapie sehr arbeitsintensiv und langsam [5, 14, 58]. Wir haben viele Transkriptomdaten gemeinsam normalisiert und für die weitere systematische Analyse einen Algorithmus zur Identifizierung überexprimierter Gene mit durch diese kodierten spezifischen Peptiden mit hoher MHC-I-Affinität entwickelt. Diesen Algorithmus automatisierten wir mit Hilfe der Bioinformatikerin Julia Gerke mit dem Programm RAVEN (Rich Analysis of Variable gene Expressions in Numerous tissues)[58], sodass nun auch mit neuen zusätzlichen Transkriptom-Daten eine schnelle automatisierte Suche nach tumorspezifischen Peptiden für eine T-Zell-basierte Immuntherapie durchgeführt werden kann.

Sowohl unsere Datensets mit normalisierten Microarray-Genexpressionsdaten von 50 Tumorarten und 71 Normalgewebearten als auch die von uns identifizierten tumorspezifischen Gene, die tumorspezifischen Peptide und nicht zuletzt die Software RAVEN sollen eine große Ressource für die Entwicklung neuer Immuntherapien, insbesondere adaptiver T-Zell-Transfers, darstellen [58].

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Microarray Expressionsdaten

Öffentlich verfügbare Genexpressionsdaten für 3078 Gewebeproben, die auf dem Affymetrix GeneChip Human Genoma U133 Plus2.0 (HG-U133Plus2.0) Microarray generiert wurden, wurden vom Gene Expression Omnibus (GEO) oder der Array Express Datenbank am European Bioinformatics Institute (EBI) bezogen. Nach der Qualitätskontrolle, die nachfolgend noch näher erläutert wird, gingen 2678 Microarrays, die 50 Tumorarten und 71 Normalgewebearten einschließen, in unsere Analysen ein. Die Zugangs-Codes dieser 2678 Microarrays sind in Tabelle 3.1 dargestellt [58].

Ein Microarray erlaubt die parallele Analyse von tausenden von Einzelproben in geringen Mengen. Je nach Probenmaterial spricht man z.B. von einem Gewebe-Microarray (TMA, wird später genauer erläutert) oder in diesem Fall von einem DNA-Microarray. Der Aufbau eines DNA-Microarrays ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. An genau definierten Positionen sind hier Oligonukleotide als Sonden (sogenannte probes) angebracht, an die DNA oder cDNA aus Probenmaterial bindet. Über Fluoreszenzsignale wird erfasst, wieviel DNA an welcher Position gebunden wurde und damit im Probenmaterial vorhanden war. Dadurch kann mit einem DNA-Microarray untersucht werden, wie stark welche Gene in Zellen exprimiert werden. Für jedes Gen gibt es mehrere probes auf einem Microarray, die zusammen probe set genannt werden.

Tabelle 3.1: Zugangs-Codes der verwendeten Microarrays [58]

Gewebetyp	Geschlecht	Zugangs-Code	Anzahl n an Samples
Normaler Bronchus	beide	GSE14461, GSE7307	6
Normale Brust	beide	GSE26457	25
Normale B-Zellen	beide	GSE31048	15

Normaler Dünndarm	beide	GSE18676, GSE43346, GSE63626, GSE7307	20
Normales Fettgewebe	beide	GSE41168	25
Normale Gallenblase	beide	GSE43346, GSE63626	4
Normale Gefäße arteriell	beide	GSE43346, GSE7307	8
Normale Gefäße venös	beide	GSE43346, GSE7307	7
Normales Gehirn Accumbens	beide	GSE7307	14
Normales Gehirn Amygdala	beide	GSE7307	8
Normales Gehirn Area tegmentalis ventralis	beide	GSE7307	7
Normales Gehirn Caudatus	beide	GSE7307	4
Normales Gehirn Corpus callosum	beide	GSE7307	9
Normales Gehirn Cortex	beide	GSE7307	35
Normales Gehirn Hippocampus	beide	GSE7307	8
Normales Gehirn Hypophyse	beide	GSE7307	6
Normales Gehirn Hypothalamus	beide	GSE7307	8
Normales Gehirn Mittelhirn	beide	GSE7307	7
Normales Gehirn Nuclei vestibulares superiores	beide	GSE7307	7
Normales Gehirn Nucleus nodosus	beide	GSE7307	8
Normales Gehirn Nucleus subthalamicus	beide	GSE7307	9
Normales Gehirn Pallidum	beide	GSE7307	6
Normales Gehirn Pons	beide	GSE7307	1
Normales Gehirn Putamen	beide	GSE7307	13
Normales Gehirn Substantia nigra	beide	GSE7307	16
Normales Gehirn Thalamus	beide	GSE7307	9
Normales Gehirn Trigeminal Ganglien	beide	GSE7307	8
Normale Haarfollikel-Stammzellen	beide	GSE44765	18
Normale hämatopoetische Stammzellen	beide	GSE19429	9
Normale Harnblase	beide	E-MTAB-1940, GSE30522, GSE43346, GSE61352	10
Normale Haut	beide	GSE13355	25
Normales Herz	beide	GSE18676, GSE43346, GSE7307	10

Normaler Hoden	männlich	GSE25518, GSE43346, GSE7307	10
Normales Kleinhirn	beide	GSE7307	11
Normales Knochenmark	beide	GSE11504	25
Normale Kolonmucosa	beide	GSE8671	25
Normale Leber	beide	GSE40231	22
Normale Lunge	beide	GSE40791	25
Normaler Lymphknoten	beide	GSE43346, GSE7307	5
Normaler Magen	beide	GSE18676, GSE43346, GSE7307	14
Normale Makrophagen	beide	GSE2125, GSE43346	30
Normale Milz	beide	GSE18676, GSE25550, GSE43346, GSE7307	13
Normale Monozyten	beide	GSE7158	25
Normaler Nävus	beide	GSE53223	12
Normale Nebenniere	beide	GSE10927, GSE19750, GSE43346, GSE7307	19
Normale Niere	beide	GSE11151, GSE18676, GSE43346, GSE7307	14
Normale orale Mukosa	beide	GSE30784	25
Normales okuläres Endothel	beide	GSE20986	8
Normaler Ösophagus	beide	GSE43346, GSE63626, GSE63941, GSE7307	14
Normales Ovar	weiblich	GSE18520, GSE43346, GSE7307	13
Normales Pankreas	beide	GSE18676, GSE22780, GSE43346, GSE7307	4

Normaler Penis	männlich	GSE7307	6
Normale pharyngeale Mukosa	beide	GSE7307	4
Normale Prostata	männlich	GSE43346, GSE7307	14
Normale Retina	beide	GSE12621, GSE28133	20
Normales Rückenmark	beide	GSE7307	9
Normale Schilddrüse	beide	GSE33630	25
Normaler Skelettmuskel	beide	GSE40231	14
Normale Speicheldrüsen	beide	GSE18676, GSE40611, GSE7307	11
Normale Synovialmembran	beide	GSE7307	6
Normaler Thymus	beide	GSE18676, GSE43346, GSE46170, GSE7307	10
Normale Tonsille	beide	GSE43346, GSE7307	4
Normale Trachea	beide	GSE18676, GSE43346, GSE7307	6
Normale T-Zellen	beide	GSE14926, GSE6338	25
Normale Urethra	beide	GSE7307	5
Normaler Uterus Endometrium	weiblich	GSE7307	23
Normaler Uterus Myometrium	weiblich	GSE7307	22
Normale Vagina	weiblich	GSE7307	4
Normales Zahnfleisch	beide	GSE16134	25
Normale Zervix	weiblich	GSE27678, GSE7307	7
Normale Zunge	beide	GSE7307	10
ACP (Adamantinöses Kraniopharyngiom)	beide	GSE68015	15
Alveoläres Weichteilsarkom	beide	GSE13433, GSE32569	13
Astrozytom Grad 3	beide	GSE4290	26
ATRT	beide	GSE19404, GSE35493	16
CLL	beide	GSE39671	49
CML	beide	GSE13159	47
CPP (Choroidalplexuspapillom)	beide	GSE68015	4

Desmoidtumor	beide	GSE58697	50
Diffuses intrinsisches pontines Gliom	beide	GSE26576	27
DLBCL	beide	GSE53786	49
Ependymom	beide	GSE21687, GSE26576	50
Ewing-Sarkom	beide	GSE34620	50
Ewing-like BCOR-CCNB3	beide	GSE34800	10
Ewing-like CIC-DUX4	beide	GSE60740	14
Ewing-like EWSR1-NFATc2	beide	GSE60740	7
Follikuläres Lymphom	beide	GSE53820	50
Germinom	beide	GSE19348	6
GIST	beide	GSE17743, GSE8167	61
Glioblastom	beide	GSE53733	50
Hodgkin Lymphom	beide	GSE17920	47
Leiomyom uterin	beide	GSE13319	50
Leiomyosarkom	beide	GSE21050	50
Liposarkom	beide	GSE21050	50
MALT-Lymphom	beide	GSE13314, GSE25550	48
Mantelzell-Lymphom	beide	GSE36000	38
MDS	beide	GSE29326, GSE30195	35
Medulloblastom G3	beide	GSE37418	16
Medulloblastom G4	beide	GSE37418	39
Medulloblastom SHH	beide	GSE37418	10
Medulloblastom WNT	beide	GSE37418	8
Meningiom	beide	GSE4780	51
Mesotheliom pleural	beide	E-MTAB-1719	38
MPNST	beide	GSE68015	6
Multiples Myelom	beide	GSE19784	46
Nephroblastom	beide	GSE53224	50
Neuroblastom	beide	GSE16476	49
Oligodendrogliom	beide	GSE4290	51
Osteosarkom	beide	E-MEXP-3628, GSE14827, GSE33458	40
Pädiatrische ALL BCP	beide	GSE47051	33
Pädiatrische AML	beide	GSE17855	46
Pädiatrische T-ALL	beide	GSE39816, GSE47051	54
Pädiatrisches Glioblastom	beide	GSE19578	33
Pilozytisches Astrozytom	beide	GSE50161	12

PNET	beide	GSE19404, GSE35493	20
Retinoblastom	beide	GSE29683	50
Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-negativ	beide	E-TABM-1202	20
Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-positiv	beide	E-TABM-1202	45
Rhabdomyosarkom embryonal	beide	E-TABM-1202	36
Synovialsarkom	beide	GSE20196	34
Undifferenziertes pleomorphes Sarkom	beide	GSE21050	50
<i>n</i> total			2678

3.1.2 Chip Description Datei (CDF)

Zur Analyse von Genexpressions-Microarrays wird eine CDF benötigt, welche die probe sets des Microarrays den entsprechenden Genen zuordnet. Eine möglichst exakte Annotation der auf dem Microarray enthaltenen probes bildet deshalb die Grundlage für valide Ergebnisse bei der Analyse von Genexpressions-Microarrays. Wir verwendeten in unseren Analysen die CDF von Brainarray, Version 21, für die die probe set Zusammensetzung der Gene regelmäßig anhand neuester Erkenntnisse über das Transkriptom und Genom aktualisiert wird und eine verbesserte Annotation der Gene erlaubt [61]. Die CDF kann hier bezogen werden: http://brainarray.mbni.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF/CDF_download.asp#v21 [58].

3.1.3 Humane Zelllinien und Zellkultur

Eine Liste der verwendeten Zelllinien wird in Tabelle (3.2) dargestellt.

Tabelle 3.2: Zelllinien [58]

Zelllinie	Tumorart	Zur Verfügung gestellt von
A673	Ewing-Sarkom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
ES7	Ewing-Sarkom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW1	Ewing-Sarkom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW16	Ewing-Sarkom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW17	Ewing-Sarkom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW18	Ewing-Sarkom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW22	Ewing-Sarkom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
EW23	Ewing-Sarkom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
TC-71	Ewing-Sarkom	Children's Oncology Group (COG), Monrovia, CA, USA

MES-SA	Leiomyosarkom	Dr. rer. nat. Marcus Renner, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
SK-LMS	Leiomyosarkom	Dr. rer. nat. Marcus Renner, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
SK-UT-1	Leiomyosarkom	Dr. rer. nat. Marcus Renner, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
SW872	Liposarkom	Dr. rer. nat. Marcus Renner, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
T449	Liposarkom	Dr. rer. nat. Marcus Renner, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
T778	Liposarkom	Dr. rer. nat. Marcus Renner, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
IMR32	Neuroblastom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
SK-N-AS	Neuroblastom	ATCC, Manassas, VA, USA
SK-N-BE	Neuroblastom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
TGW	Neuroblastom	Dr. O. Delattre, Institut Curie, Paris, Frankreich
CRL-1544	Osteosarkom	Prof. Dr. rer. nat. Peter Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, München, Deutschland
CRL-1547	Osteosarkom	Prof. Dr. rer. nat. Peter Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, München, Deutschland
HOS	Osteosarkom	Prof. Dr. rer. nat. Peter Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, München, Deutschland
MG-63	Osteosarkom	Prof. Dr. rer. nat. Peter Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, München, Deutschland
Saos-2	Osteosarkom	Prof. Dr. rer. nat. Peter Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, München, Deutschland
U2OS	Osteosarkom	Prof. Dr. rer. nat. Peter Nelson, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, München, Deutschland
RA36	Rhabdomyosarkom	Prof. Beat Schäfer, Experimentelle Infektiologie und Krebsforschung, Kinderspital, Universität Zürich, Zürich, Schweiz

RD	Rhabdomyosarkom	Prof. Beat Schäfer, Experimentelle Infektiologie und Krebsforschung, Kinderspital der Universität Zürich, Zürich, Schweiz
Rh30	Rhabdomyosarkom	Prof. Dr. Kappler, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
Rh4	Rhabdomyosarkom	Prof. Dr. Kappler, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
RMS13	Rhabdomyosarkom	Prof. Dr. Kappler, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München, Deutschland
HLA*A02:01+T2	TAP-defiziente Zelllinie	Prof. Dr. P. Cresswell, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 Medium mit 10% FCS , 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert. Diese Substanzen wurden ebenso wie Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) und phosphate buffered saline (PBS) ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (L2143) über Biochrom (Berlin, Deutschland) bezogen. Wir verwendeten DMSO der Firma Sigma-Aldrich/Merck (D4540-100ml) sowie Plasmocure von InvivoGen zur Elimination von Mykoplasmen. Die TAP-defiziente HLA*A02:01+ T2 Zelllinie (Somatisches Zellhybrid) erhielten wir von P. Cresswell (Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA). Die T2 Zellen wuchsen in RPMI 1640 Medium mit zusätzlicher Supplementierung von 1 mM Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren (beides Biochrom) [58].

3.1.4 RNA-Extraktion und qRT-PCR

Zur RNA-Extraktion wurde das Nucleospin RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die RNA wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) revers transkribiert. Für qRT-PCRs wurde der SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) verwendet. Oligonukleotide bezogen wir von MWG Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland). Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet [58].

Tabelle 3.3: Primer-Sequenzen [58]

Ziel-Gen	Vorwärtsstrang Sequenz (5' zu 3 ')	Rückwärtsstrang Sequenz (5' zu 3 ')
CAPN6	ACCCAGGCCATTTTCTACAG	GGTACAGAGACTTCAGATCACG
CHRNA1	CAACCAATGTGCGTCTGAAAC	GTTATAGAGAACAAGGTCTGGGC
CPA5	ATGAGGAAAGACAGGCCATG	TGAGACAATATCGGAATGCTCC
MYF5	ATGCCATCCGCTACATCG	CCAGACAGGACTGTTACATTCG
PANX3	GGCCAGGACAAAATGAAATCTC	ATGATGAACAGCAGATCGGAG
PAX7	AGATTCTTTGCCGCTACCG	CTGAACATGCCTGGGTTTTTC
PHOX2A	CCACTACCCCGACATTTACAC	CTCCTGTTTGCGGAACTTG
PHOX2B	ACTCACTACCCCGACATCTAC	CTCCTGCTTGCGAACTTG
RBM11	GAGATTCTGTACGAGCTGTTCC	GCTTTCCTTCTCTGTCTTTGC

RPLP0 | GAAACTCTGCATTCTCGCTTC | GGTGTAATCCGTCTCCACAG

3.1.5 Konstruktion von Gewebe-Microarrays (TMAs)

Am Pathologischen Institut der LMU München, Deutschland, wurden Paraffinblöcke aus folgenden Institutionen zusammengetragen: Pathologisches Institut der LMU München (München, Deutschland), Department of Pathology Turgut Ozal Medical Center der Inonu University (Malatya, Türkei), Başkent University Hospital (Ankara, Türkei), Sapporo Medical University (Sapporo, Japan) und Bone Tumor Reference Center Institute of Pathology of the University Hospital of Basel (Basel, Schweiz). Eine Übersicht über die einbezogenen Tumorarten und Normalgewebe gibt Tabelle (3.4)[58].

Tabelle 3.4: Gewebearten im TMA [58]

Gewebeart	Anzahl
Normale Appendix	3
Normale Brust	3
Normales Duodenum	3
Normale Ektozervix	3
Normales Endometrium	3
Normale Endozervix	3
Normales Fett	3
Normale Gallenblase	3
Normale Harnblase	3
Normale Haut	3
Normales Herz	2
Normaler Hoden	3
Normales Ileum	3
Normales Knochenmark	1
Normales Kolon	3
Normale Leber	3
Normale Lunge	3
Normaler Lymphknoten	3
Normaler Magen Antrum	3
Normaler Magen Corpus	3
Normale Milz	3
Normaler Muskel	3
Normales Myometrium	3
Normaler Nebenhoden	3
Normale Nebenniere	3
Normale Nebenschilddrüse	3
Normale Niere	3

Normaler Ösophagus	3
Normales Ovar	3
Normales Pankreas	3
Normale Parotis	3
Normale Plazenta	3
Normale Prostata	3
Normales Rektum	3
Normale Schilddrüse	3
Normaler Thymus	3
Normale Tonsille	3
Normale Trachea	3
Normale Tuba uterina	3
Normaler Ureter	3
Normale Vagina	3
Alveoläres Weichteilsarkom	3
Ewing-Sarkom	82
Ganglioneuroblastom	7
GIST	16
Leiomyom (uterin)	25
Leiomyosarkom	13
Liposarkom dedifferenziert	7
Liposarkom gut differenziert	29
Liposarkom myxoid	9
Mesotheliom (pleural)	20
Nephroblastom	21
Neuroblastom	16
Osteosarkom	15
Rhabdomyosarkom (RMS)	11
Synovialsarkom	10
Undifferenziertes pleomorphes Sarkom	5
<i>n</i> total	409

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Antikörper für Immunhistochemie (IHC)

Die Gewebeschnitte wurden mithilfe des iView DAB Detektionskit (Ventana Medical System, Tucson, AZ) gefärbt. Für immunhistochemische Analysen bezogen wir einen monoklonalen murinen Antikörper gegen humanes PAX7 [62] von der Developmental Studies Hybridoma Bank (Cat.No. PAX7c; Iowa City, IA). Im anschließenden Inkubationsschritt wurde ein biotinylierter Peroxidase-konjugierter anti-Maus IgG Antikörper (ImmPress - Reagent Kit) verwendet [58]. Zur Detektion des Zielantigens wurde das ABC-Kit chromogen (Dako, K3461) verwendet.

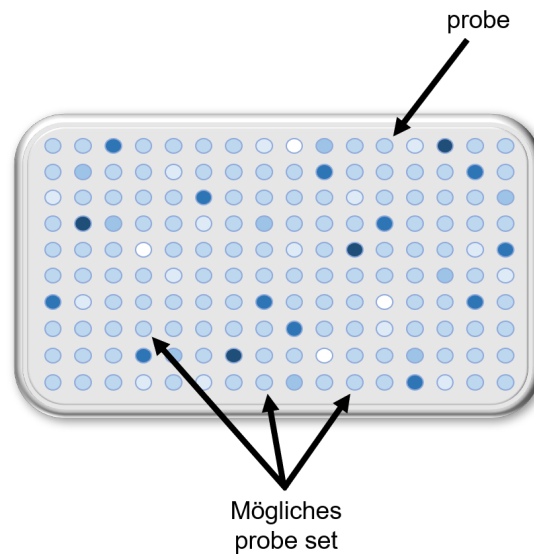


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Microarrays

3.1.6.2 Antikörper für Immunfluoreszenz

Im T2-Peptidbindungsversuch wurde ein FITC muriner Antikörper gegen humanes HLA-A2 (BD PharmingenTM, Clone BB7) verwendet. Zur Isotyp-Kontrolle diente ein BB515 muriner IgG2a,αAntikörper (BD HorizonTM, Clone G155-178) [58].

3.1.7 Peptide

Alle Peptide wurden mit der LIPS[®] Technologie als Festphase synthetisiert (peptides & elephants, Potsdam, Deutschland). Dabei diente Trifluoracetat als Gegenion. Als Positivkontrolle verwendeten wir ein hochaffines Influenza A Virus Matrixprotein Epitop (M1₅₈₋₆₆; Sequenz GILGFVFTL) [63].

Die Peptidsequenzen der untersuchten Peptide sind in Tabelle 3.5 dargestellt [58].

Tabelle 3.5: Peptidsequenzen [58]

Peptid-Nr.	Sequenz
1	FTLEFDSPV
2	MLPDLTLEA
3	FLILSIAPV
4	LLFPYPSSI
5	FLWSDGVPL
6	LILGVIVKV
7	GAFGFQHPV
8	VLQTYVAFL

9	SLASYLLFL
10	LLLSGAARA
11	LLSNITLGV
12	ILMTVLWFT
13	HLFDGQALL
14	SLHCWVLAV
15	GILNLNKMV
16	FALANVYAV
17	SLMTKINEL
18	KLLNQLGMI
19	YAIALLNGI
20	QLAAFNHLL
21	KLAAASLLL
22	SLNGTTMTL
23	SIFKPIFYV
24	GMSQILIHV
25	WLCSPLGAL
26	FILKQEYYL
27	GMAGAIHFL
28	KTALILLSI
29	LLAMVLTSA
30	LLVTLSLAI
31	GLIVLLYSV
32	RLFCDPFTL
33	LVCSTLTHV
34	IMQNNSINV
35	YLPKGVPGV
36	FLIRLVAKA
37	SLAPTMFFL
38	RLAVRVLAV
39	ILAKYRVGV
40	FLQDRTPSA
41	GMPECNSPV
42	FVSSRIEAV
43	RLLAHLAT
44	SLHISSYGV
45	SLIINVNV
46	FLLMCEIPM
47	GLYSASFHA
48	SLADAALLV
49	FINEQNLEL
50	TMMDGSFSF
51	KMSTINEAV

52	GLVSSISRV
53	KMSEASMIV
54	KMSESVSSL
55	ILDSLVAEV
56	GLLEGLETL
57	MLMQPAAKV
58	HLMACFTCA
59	VLTSYYSFV
60	VLQTNPNPV
61	YQSQKLWQI
62	AMLKNTVPI
63	FQSSLQSPV
64	IMTRGMMFV
65	FIVNCTVNV
66	SLIDGTFII
67	SLGGPFASV
68	AIYTILVPV
69	ALSSDLLFI
70	KMLPKNCSL
71	HQLGHLPPi
72	FQLAVDLPA
73	FLWSCWVLV
74	QLSGLPEFV
75	ALMEAMHTV
76	VLYFALIVV
77	MLDTVLEAL
78	AMYTNLHAV
79	ALICCFHEA

3.1.8 Ethik-Genehmigung für humane Proben

Humane Gewebeproben wurden am Pathologischen Institut der LMU München (Deutschland) mit Genehmigung der jeweiligen Ethikkommissionen gesammelt. Die Ethikkommission der Universitätsklinik der LMU München bewilligte diese Studie (Bewilligungsnummer 307-16 UE)[58].

3.2 Methoden

3.2.1 Qualitätskontrolle der Microarrays

Vor Einschluss in unsere Studie wurden die Microarrays auf ihre Qualität geprüft. Dazu analysierten wir in der statistischen Sprache R (R Development Core Team; Version 2.2)

mithilfe der Bioconductor packages `affyPLM` [64] und `hgu133plus2hsentrezgcdf` [61] die Relative Log Expression (RLE) und Normalized Unscaled Standard Error (NUSE) Scores, mit welchen eine Aussage über die Homogenität der probe sets getroffen werden kann. Die RLE und NUSE Werte wurden in R folgendermaßen berechnet [58]:

```
library(affyPLM)
library(hgu133plus2hsentrezgcdf)
setwd("Dateipfad der Microarrays angeben, z.B. D:/Alle-Microarrays")
data<-ReadAffy()
data@cdfName<-"hgu133plus2hsentrezgcdf"
x<-fitPLM(data,background.method="RMA.2")
RLE<-RLE(x,type="stats")
NUSE<-NUSE(x,type="stats")
write.table(RLE,"Dateipfad, wo RLE-Ergebnisse gespeichert werden sol-
len, z.B. D:/RLE-Ergebnisse.txt")
write.table(NUSE,"Dateipfad, wo NUSE-Ergebnisse gespeichert werden
sollen, z.B. D:/NUSE-Ergebnisse.txt")
```

Hinter der Berechnung des RLE Wertes steht die Berechnung der logarithmierten Expression eines probe sets in diesem Microarray im Verhältnis zur medianen Expression dieses probe sets in allen anderen in der Analyse enthaltenen Microarrays. Diese RLE-Werte werden üblicherweise als Boxplot dargestellt. Unter der Annahme, dass sich die Expression der meisten probe sets unter den Microarrays nicht wesentlich unterscheiden sollte, wird ein Median der RLE-Werte eines Microarrays, der nahe 0 lokalisiert ist, als von hoher Qualität interpretiert. Darüber hinaus sollte die Streuung, die in Form des Interquartilabstands (IQR für englisch Interquartile Range) der RLE-Werte eines Microarrays beurteilt wird, derer der anderen Microarrays ähnlich sein [58, 65].

Bei der Kalkulation der NUSE-Werte werden für jedes Gen die Standardfehler des Probe Level Model (PLM) zwischen den Microarrays so standardisiert, dass der mediane Standardfehler des jeweiligen Gens 1 ist. Microarrays mit erhöhten NUSE-Werten im Vergleich zu den anderen Microarrays unterscheiden sich damit in Bezug auf die Variabilität der Expression zwischen Genen von den anderen Microarrays und werden als von schlechter Qualität interpretiert [65, 58].

Zur Qualitätsbeurteilung der Microarrays analysierten wir den Median und den IQR sowohl der RLE als auch der NUSE Werte.

Wie von Ben Bolstad im Programm RMAExpress vorgeschlagen [66], wurden die Grenzwerte, die eine hohe Qualität eines Microarrays definieren, in Abhängigkeit der Quartile (Q) und Interquartilabstände (IQR) jeweils für RLE Median, RLE IQR, NUSE Median und NUSE IQR wie folgt festgelegt:

$$(Q1 - [1.5 * IQR]) \text{ und } (Q3 + [1.5 * IQR]) \text{ [66].}$$

Um Zugang in unsere Analyse zu finden, musste ein Microarray gute Werte für alle vier Parameter (RLE Median, RLE IQR, NUSE Median, NUSE IQR) aufweisen [58].

3.2.2 Erstellen der Expressionstabelle mit RMAExpress

Alle Microarrays wurden in R mit dem Robust Multichip Average (RMA) Algorithmus [67] einer simultanen Normalisierung bestehend aus Hintergrund-Adjustierung, Quantil-Normalisierung und Summation unterzogen. Dazu wurden die Custom Brainarray Chip Description Files (ENTREZG, v21) verwendet, die zu einem optimierten Probe-set pro Gen führen [61]. So erstellten wir eine Genexpressionstabelle mit Microarray-Genexpressions-Intensitäten zu 20363 Genen in den von uns verwendeten 2678 Samples [58].

3.2.3 Identifikation von tumorspezifischen Genen - CSG-Scores

Mithilfe der Genexpressionstabelle identifizierten wir tumorspezifische Gene (CSGs für englisch 'Cancer-specific genes'), die im Tumor in Relation zu Normalgeweben überexprimiert sind. Dazu berechneten wir die adjustierte Überexpression eines Gens x in einer bestimmten Tumorart c , indem wir das adjustierte obere Quartil – den Bereich zwischen der 75. und 95. Perzentile – seiner Expressionssignale betrachten. Mit diesem Ansatz soll verhindert werden, dass extreme Ausreißer in einer kleinen Untergruppe der Proben (über der 95. Perzentile [$Q95$]) [68] einen Bias verursachen. Der sogenannte Überexpressions-Score (OS für englisch 'Outlier Score') sei dann der logarithmierte Mittelwert des adjustierten oberen Quartils der Expression eines Gens x in Tumorart c :

$$OS_{x,c} = \log_2 \text{Mittelwert}(Q75_{x,c}, Q95_{x,c})$$

Analog sei der sogenannte Straf-Score (PS für engl. 'Penalty Score') für Gen x der logarithmierte Mittelwert des adjustierten oberen Quartils der Expressionsintensitäten der am höchsten exprimierten Normalgewebe-Art unter allen untersuchten humanen Normalgeweben n :

$$PS_{x,n} = \log_2(\text{Max}(\text{Mittelwert}(Q75_{x,n}, Q95_{x,n})))$$

Der CSG-Score für ein Gen x in einer gegebenen Tumorart c sei dann

$$CSG_{x,c} = OS_{x,c} - PS_{x,n} \quad (3.1)$$

Vorbeschriebene Algorithmen beinhalten Gewichtungsscores für verschiedene Normalgewebetypen, die auf deren subjektiver Lebensnotwendigkeit oder deren vermutetem Ausmaß an Immunprivilegien basieren, sodass beispielsweise Hodengewebe von der Berechnung etwaiger Straf-Scores völlig ausgeschlossen wurde [68, 69]. Im Gegensatz dazu betrachten wir jeden Normalgewebetyp, Hodengewebe eingeschlossen, als gleichwertig und gleichrangig bedeutend für die Berechnung des Straf-Scores eines Gens x . Allerdings berechneten wir die CSG-Scores geschlechterspezifisch, da geschlechtsspezifische Gewebetypen wie Uterus und Ovar bzw. Prostata und Hoden irrelevant für die Nominierung von CSGs für das jeweils andere Geschlecht sind. Dazu wurden die geschlechtsspezifischen Gewebe bei der Berechnung des PS für das jeweils andere Geschlecht ausgeschlossen (Übersicht über ein- und ausgeschlossene Gewebe in Tabelle 3.1). Ein CSG-Score wurde als hoch interpretiert,

wenn er gleich der 99,9. Perzentile aller CSG-Scores, die über unsere 50 Tumorarten hinweg berechnet wurden, war oder diese überschritt. Unter Anwendung dieses Grenzwertes definieren in unserem Datenset CSG-Scores über 2,001 ihre zugrundeliegenden Gene als CSGs, welche damit als potenziell geeignete immuntherapeutische Zielstrukturen für die entsprechende Tumorart interpretiert werden und weiter untersucht werden. CSG-Scores über 3 wurden empirisch als hoch und solche über 4 als sehr hoch angesehen [58].

3.2.4 Zellkultur

Die Zellen wuchsen bei 37°C in befeuchteter 5% CO₂ Umgebung in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden regelmäßig mittels qRT-PCR auf Mykoplasmen-Infektionen untersucht und im Falle einer solchen mit Plasmocure behandelt. Die TAP-defiziente HLA*A02:01+ T2 Zelllinie wuchs in RPMI 1640 Medium mit 1 mM Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren. Die Reinheit der Zelllinien wurde regelmäßig durch short tandem repeat profiling (STR-profiling) bestätigt.

3.2.5 RNA-Extraktion, reverse Transkription und qRT-PCR

Die RNA aus Zelllinien wurde mit dem Nucleospin RNA Kit extrahiert, welches einen 15-minütigen Schritt zur Degradation genomischer DNA enthält. Die damit erhaltene RNA wurde dann mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit revers zu cDNA transkribiert. Die qRT-PCRs wurden mit dem SYBR Select Master Mix durchgeführt. Die cDNA wurde in einer Verdünnung von 1:10 und die Primer in einer Konzentration von 0,5 µM verwendet. Die Primersequenzen können Tabelle 3.3 entnommen werden. Alle qRT-PCRs wurden mit 10-20 µl Endvolumen auf einem CFX Connect Instrument (Bio-Rad) anhand eines mehrschrittigen Protokolls durchgeführt: 2 min bei 95°C Enzymaktivierung und Denaturierung, anschließend 50 mal abwechselnd 10s bei 95°C Denaturierung und 20s bei 60°C Annealing und Extension. Die qRT-PCRs wurden mithilfe des CFX Manager 3.1 (Bio-Rad) analysiert. Die Genexpressions-Levels der untersuchten Gene wurden gegen das Haushaltsgen RPLP0 [70] normalisiert [58] und mit der 2-DeltaDeltaCT-Methode berechnet [71].

3.2.6 Immunhistochemie (IHC)

IHC-Analysen wurden auf Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeproben durchgeführt. Für jeden Paraffinblock markierte ich auf einem mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitt Regionen mit repräsentativem Tumor- bzw. Normalgewebe. Aus diesen Regionen entnahm Mona Melz pro Paraffinblock 3 zylindrische Gewebestangen mit einem Durchmesser von 1 mm, um einen Gewebe-Microarray (englisch tissue microarray (TMA)) zu erstellen. Eine schematische Darstellung eines TMAs zeigt Abbildung 3.2

Von jedem TMA-Block wurden 4 µm dicke Schichten geschnitten und von Andrea Sendelhofert und Anja Heier mit dem iView DAB Detektionskit (Ventana Medical System,

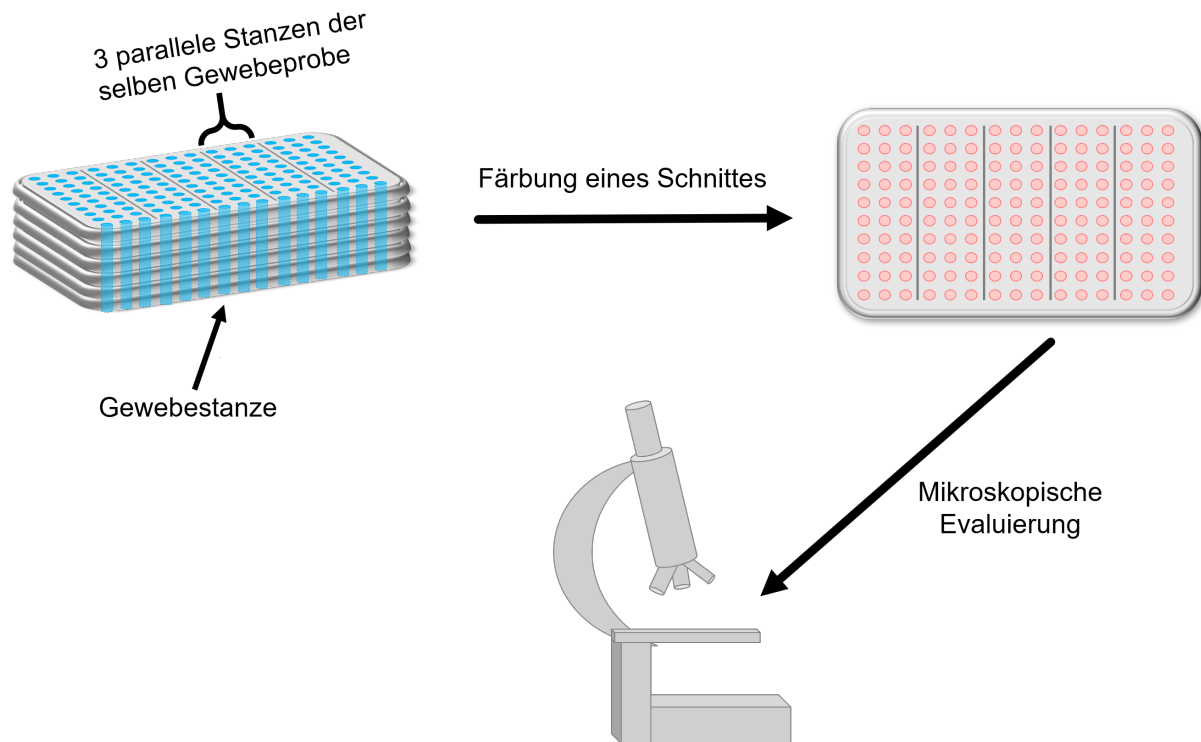


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines TMA

Tucson, AZ) gemäß des Protokolls des Unternehmens gefärbt. Nach der Antigendemaskierung (antigen retrieval) mithilfe von TRIS Puffer und Blockade der endogenen Peroxidase mit 7,5% wässriger H_2O_2 -Lösung wurden die TMA-Schnitte mit einer Verdünnung von 1:180 für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einem monoklonalen murinen Antikörper gegen humanes PAX7 gefärbt [62]. Anschließend wurden die Schnitte mit einem biotinylierten anti-Maus IgG Antikörper inkubiert. Die Detektion des Zielantigens erfolgte schließlich mithilfe des ABC-Kit chromogen für 10 Minuten (Dako, K3461) [58].

3.2.7 Evaluation der Immunoreaktivität

Für jede Probe wurden drei Stanzen in hoher Auflösung (40fach) beurteilt. Die semiquantitative Evaluation der Immunoreaktivität wurde von zwei unabhängigen und in Histopathologie geübten Medizinern durchgeführt. Die Intensität der Immunoreaktivität wurde als Intensitäts-Score 0 = keine, Grad 1 = schwach, Grad 2 = moderat und Grad 3 = stark klassifiziert. Der jeweils zugewiesene Prozentual-Score war 0, wenn Immunoreaktivität in weniger als 20% der Zellen zu beobachten war, 1 bei 20-39%, 2 bei 40-59%, 3 bei 60-79% und Score 4 bei 80% oder mehr immunoreaktiven Zellen. Zur Berechnung der insgesamten Immunoreaktivität für das gegebene Protein multiplizierten wir den Intensitäts-Score mit dem Prozentual-Score, analog zu den UICC Leitlinien zum Hormonrezeptor-Scoring in humanem Brustkrebs [58, 72].

3.2.8 Prädiktionsalgorithmen hochaffiner Peptide

Selbst wenn ein Peptid hochspezifisch für bestimmte Tumorzellen ist, so kann es nur dann immuntherapeutisch von entsprechenden T-Zell-Rezeptoren erkannt werden, wenn es durch die Zellen auch auf MHC-I-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert wird. Nicht jedes Peptid hat die gleiche Affinität und damit die gleiche Wahrscheinlichkeit, an der Zelloberfläche präsentiert zu werden. Entscheidend hierfür ist die Länge der Peptide sowie die Aminosäuresequenz, wobei die verschiedenen HLA-Allele unterschiedliche Präferenzen haben. Die meisten HLA-Allele binden bevorzugt Peptide mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren [73], als optimal gelten 9mer-Peptide [74, 75]. Generell ist für die Stärke der Bindung eines Peptids an ein HLA-Molekül die Aminosäure-Position 2 und 3 sowie der C-Terminus des Peptids, die sogenannten "anchor residues", besonders entscheidend [76]. Für die weiteren Analysen fokussierten wir uns auf Peptide mit hoher Affinität zu HLA-A02:01, welches mit einer Allelfrequenz von 0,2755 [77] der häufigste HLA-Typ unter Kaukasiern ist [78], und auf 9mer-Peptide, da diese die beste Bindung zu MHC-I-Molekülen zeigen [73, 75]. Um die Affinität zu HLA-Molekülen vorherzusagen, wurden verschiedene bioinformatische Ansätze entwickelt. Hierzu gehören unter anderem die Verwendung von Ähnlichkeitsmatrices [79], lineare Regression [80] oder künstlichen neuronalen Netzen [81, 82, 83].

Zur bioinformatischen Vorhersage hochaffiner Peptide, die von CSGs kodiert werden, nutzten wir die NetMHC Version 4.0 [73, 58]. NetMHC wird ständig aktualisiert, wenn neue Daten zu Peptidaffinitäten publiziert werden. Bei NetMHC werden MHC-Allel-spezifisch künstliche neuronale Netzwerke mit publizierten Peptid-Affinitäten der Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) sowie aus der Datenbank SYFPEITHI trainiert und dann zur Vorhersage der Affinität anderer Peptide verwendet [84, 85, 86]. Für andere Peptidlängen als 9mer-Peptide gibt es verhältnismäßig wenig publizierte Affinitätsdaten, was die Zuverlässigkeit neuronaler Netzwerke aufgrund limitierter Trainingsmöglichkeiten einschränkt. In der Version NetMHC-4.0 wurde ein Algorithmus implementiert, der eine zuverlässige Affinitäts-Vorhersage auch für andere Peptidlängen als 9mer-Peptide erlaubt, indem mit Insertionen und Deletionen von Aminosäuren fiktiv Peptide anderer Längen kreiert und deren Affinitäten untersucht werden [73]. Außerdem kann mit dieser Methode die Peptidlängen-Präferenz verschiedener MHC-Allele bestimmt werden [73]. Wenn die vorhergesagte Affinität eines Peptides stärker als eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von < 50nM ist, so wird es als ein starker Binder angesehen. Bei Werten von IC₅₀ < 500nM gilt ein Peptid als schwacher Binder [58].

3.2.9 Proteinblast

Um zu vermeiden, dass die potentiell immunogenen Peptide auch Teil der Peptidsequenz anderer und möglicherweise ubiquitär exprimierter Proteine sind, wurden die Peptidsequenzen mit der Proteindatenbank SwissProt abgeglichen. Nur Peptide, deren Sequenz nicht in anderen Proteinen vorkommt und für die der NetMHC-Algorithmus eine IC₅₀ ≤ 500 vorhergesagte, wurden näher analysiert [58].

3.2.10 Peptidbindungsversuch mit TAP-defizienten T2-Zellen

T2 Zellen können keine Antigenpeptid-Transporter (TAP für englisch 'transporter associated with antigen processing') bilden. Diese Transporter werden benötigt, um Peptide aus dem Zytoplasma ins endoplasmatische Retikulum zu transportieren, damit dort die MHC-I-Moleküle mit Peptiden beladen werden können. Somit können diese Zellen keine zelleigenen Peptide auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Die dadurch unbeladenen MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche sind instabil, sodass sich nur wenige MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche befinden. Wenn nun von extern Peptide hinzugegeben werden, die eine hohe Affinität zu den MHC-I-Molekülen aufweisen, so können diese an die MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche binden und diese dadurch stabilisieren. In der Folge kann durchflusszytometrisch mit einem Antikörper gegen das entsprechende MHC-I-Molekül nachgewiesen werden, dass sich mehr MHC-I-Moleküle als vor der Zugabe eines hochaffinen Peptides auf der Zelloberfläche befinden, wodurch auf die Affinität des zugegebenen Peptides geschlossen werden kann. Abbildung 3.3 stellt den Aufbau dieses Experiments bildlich dar [58]. Die Selektion der Peptide sowie deren Aufbereitung inklusive Aliquotierung erfolgte durch mich. Die T2-Assays wurden daraufhin freundlicherweise von Andreas Kirschner und Uwe Thiel an der Technischen Universität München durchgeführt. Die anschließende Datenauswertung wurde wieder durch mich vorgenommen.

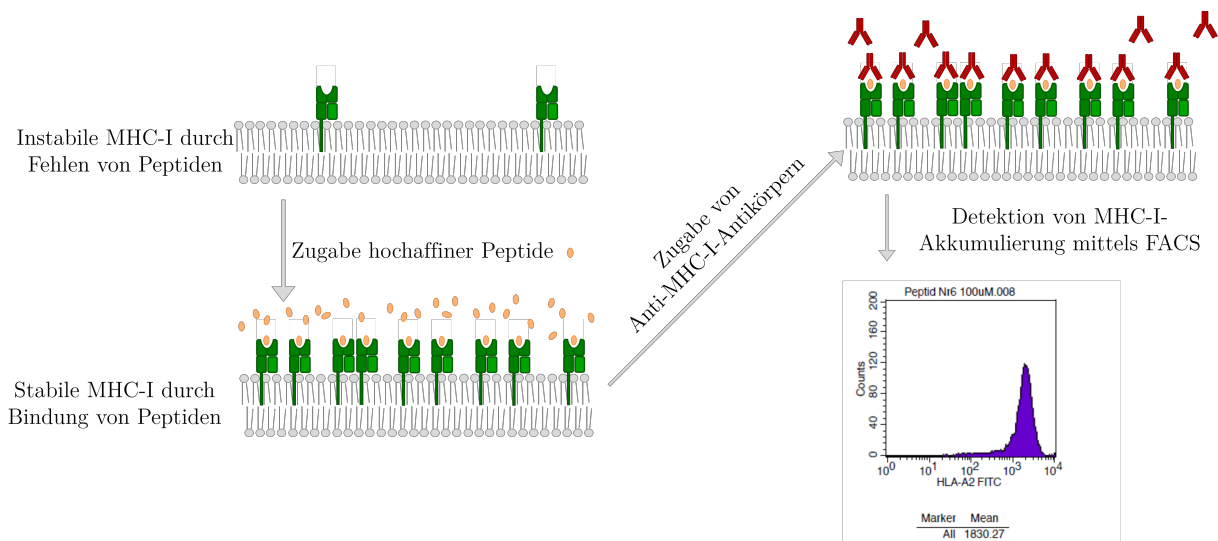


Abbildung 3.3: T2-Peptidbindungsversuch. Abbildung in Anlehnung an Baldauf et al. [58]

T2 Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 96-Well Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Well in ein Endvolumen von 200 μ l gesetzt. Die Zellen wurden mit steigenden Peptidmengen stimuliert, um die Konzentrationsabhängigkeit der MHC-I-Bindung zu bestimmen. Unstimulierte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer, zusammengesetzt aus PBS mit 2% FCS, gewaschen und für 30 Minuten bei 4°C mit einem FITC murinen Antikörper gegen humanes HLA-A2 gefärbt. Zur Isotyp-

Kontrolle verwendeten wir einen BB515 murinen IgG2a, κ Antikörper. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen, bevor sie in PBS resuspendiert und mit einem FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) analysiert wurden. Um die relative Peptidbindung zu bestimmen, wurde die Fluoreszenz-Intensität eines Peptides bei einer gewissen Konzentration durch die korrespondierende Intensität unstimulierter Zellen dividiert[58].

4. ERGEBNISSE

4.1 Übersicht über den Projektablauf

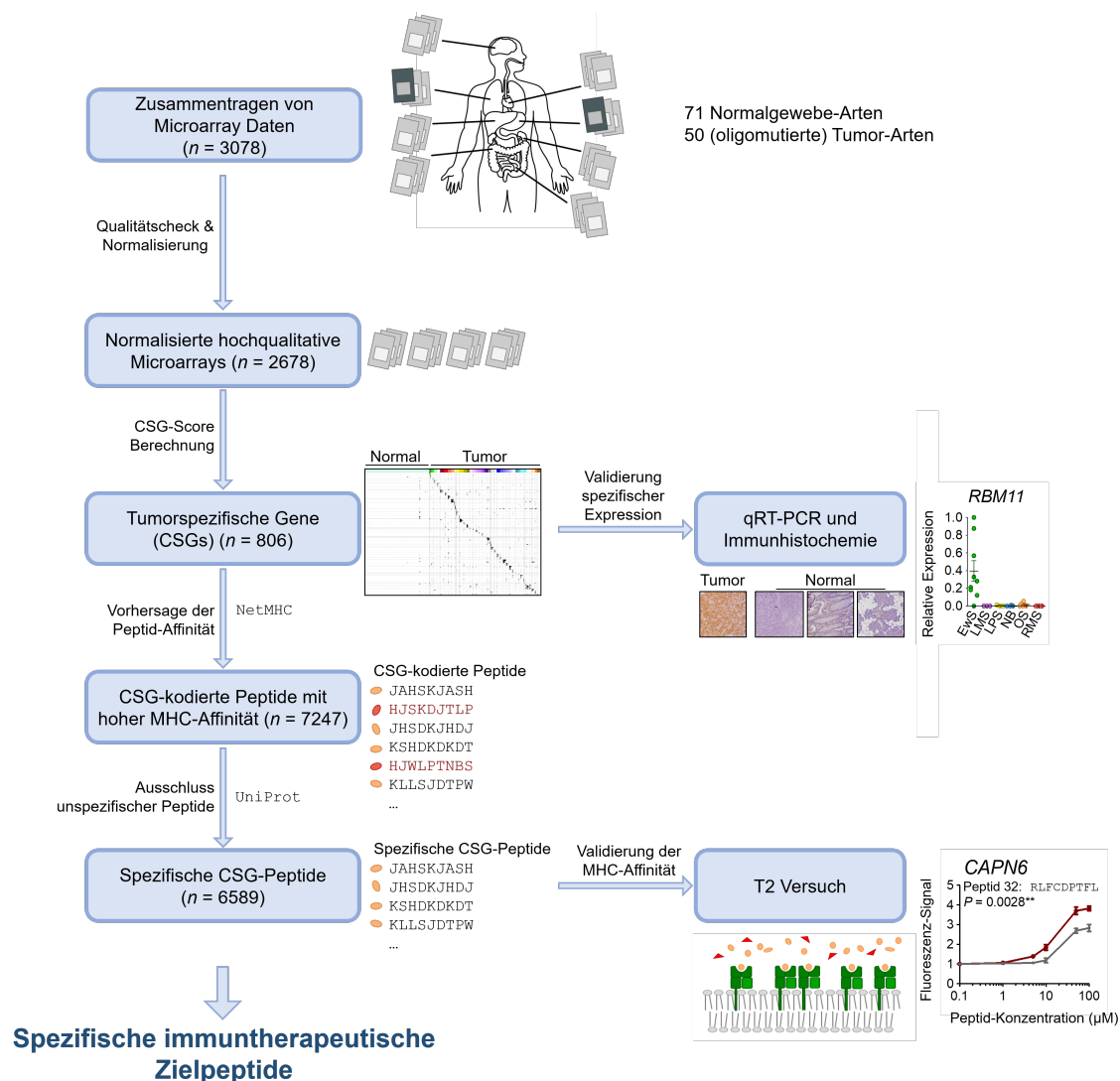


Abbildung 4.1: Übersicht über den Projektablauf. Abbildung in Anlehnung an Baldauf et al. [58]

Die Abbildung 4.1 zeigt eine kleine Übersicht über die Schritte von den Microarray-Genexpressionsdaten bis hin zur Identifizierung tumorspezifischer hochaffiner Peptide. Die frei zugänglichen Microarrays wurden zuerst einer Qualitätskontrolle unterzogen und die als 'gut' eingestuften Microarrays wurden anschließend neu normalisiert, um eine Genexpressionstabelle zu erstellen. Dann wurden mit der Berechnung eines CSG-Scores CSGs identifiziert und mithilfe von qRT-PCR und IHC validiert. Im Anschluss bestimmten wir hochaffine und spezifische Peptide proteinkodierender CSGs mittels bioinformatischer Prädiktion und validierten die MHC-Affinität im T2-Peptidbindungsversuch. Unspezifische Peptide, die auch Teil anderer Proteine als des jeweiligen CSGs waren, wurden ausgeschlossen [58].

4.2 Eingeschlossene Microarrays

Die anfangs 3078 Microarrays wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen. Daraufhin konnten 2678 hochqualitative Affymetrix Human Genome U133 Plus2 Microarrays aus 71 Normalgewebearten und 50 Tumorarten mit einem Fokus auf oligomutierten pädiatrischen Tumoren und Sarkomen (siehe Tabelle 3.1) in die Analyse einbezogen werden und wurden simultan normalisiert. Dieser Qualitätskontrolle dienten RLE- und NUSE-Scores, die im Methodenteil genauer erläutert wurden.

Da unsere CSGs zukünftig als klinische Zielstrukturen für Immuntherapien genutzt werden können, schlossen wir auch graft versus host disease (GvHD) empfindliche Normalgewebearten wie Retina oder Kolonmukosa sowie normale B- und T-Zellen ein, um den sogenannten fratricide effect zu verhindern, der bei adoptiven T-Zell-Therapien auftreten kann [58, 87, 88].

4.3 Identifizierung und Validierung überexprimierter CSGs

Frühere Studien zeigten, dass viele etablierte CSGs nur in einem Teil der entsprechenden Tumorart exprimiert werden, was oft als 'outlier' Expression [68, 89] bezeichnet wird. Tatsächlich werden viele CSGs so gut wie nicht in somatischen Normalgeweben oder ausschließlich in embryonalen Geweben oder Keimzellgeweben exprimiert [90]. Diese outlier Expression unterscheidet Tumorzellen von normalen somatischen Zellen und kann ein therapeutisches Fenster für tumorzellspezifische Therapien wie z.B. adoptive T-Zell-Therapien öffnen [91]. Außerdem kann dies die Wahrscheinlichkeit erhöhen, gegen die von den CSGs kodierten Peptide gerichtete Lymphozyten im reifen Lymphozyten-Repertoire zu finden [90], da diese nicht während der Lymphozytenentwicklung aussortiert und entfernt werden. Allerdings impliziert dieses outlier Expressionsprofil auch, dass konventionelle statistische Tests, die generell hochregulierte CSGs in vielen Tumorproben (z.B. Student's T-Test) suchen oder eine starke Überexpression in einem kleinen Anteil der Patienten ignorieren

(z.B. nichtparametrische Rang-basierte Tests wie Wilcoxon-Test), solche klinisch relevanten CSGs nicht identifizieren können [58].

4.3.1 Bioinformatische Identifikation von CSGs

Wir entwickelten einen Algorithmus, der transkriptomweit jedem Gen einen 'Outlier Score' (OS) für eine hohe Expression in einer bestimmten Tumorart sowie einen 'Penalty Score' (PS) für hohe Expression des Gens in einer Normalgewebeart zuschreibt. Beide Scores werden pro Gen für jede Tumorart bzw. für jede Normalgewebeart einzeln berechnet, Grundlage hierfür bildet der Mittelwert der Expressionshöhe der 75. und 95. Perzentile. Der Score identifiziert dadurch auch Gene, die nur in einer Untergruppe einer Tumorentität überexprimiert ist und verhindert einen hohen Score durch extrem hohe Signale in nur einzelnen Microarrays. Subtrahiert man den PS vom OS, so erhält man den Gesamtscore, genannt 'CSG Score'.

Zudem berücksichtigt unser Algorithmus, dass manche Gewebe geschlechterspezifisch sind, z.B. Uterus oder Prostata. Deshalb werden die CSG Scores geschlechterspezifisch berechnet, indem immer die Normalgewebe des anderen Geschlechts bei der Berechnung des PS nicht einbezogen werden.

Durch die Anwendung dieses Scoring-Algorithmus an unserem qualitätskontrollierten Microarray-Expressionsdatenset konnten wir 806 nicht-redundante CSGs (definiert als CSG-Score über der 99,9. Perzentile sämtlicher Scores der 50 Tumorarten) identifizieren. Eine vollständige Liste der CSGs und der korrespondierenden CSG-Scores ist online in der Publikation 'Systematic identification of cancer-specific immunogenic peptides with RAVEN' [58] in Supplementary Table 5 zu finden. Unter unseren CSGs fanden sich nicht nur viele schon etablierte CSGs wie LIPI für Ewing-Sarkome [92], PRAME für Neuroblastome [93, 94] oder Mitglieder der MAGE-Familie für Germinome [95], Neuroblastome [96], Synovialsarkome [97], Multiple Myelome [97], DLBCL [98] und Osteosarkome [99], sondern auch viele neue Kandidaten, von denen viele als therapeutische Struktur für mehrere Tumorarten geeignet zu sein scheinen (Abbildung 4.2)[58].

4.3.2 Validierung der spezifischen Überexpression von CSGs mit qRT-PCR

Für 9 ausgewählte CSGs untersuchten wir die spezifische Expression mittels qRT-PCR in einer Reihe von Tumor-Zelllinien von sechs verschiedenen Tumorarten. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen, zeigte sich ein hoch signifikanter Zusammenhang ($P \leq 0.01$; Friedman Test) zwischen den Expressionsintensitäten in den Genexpressions-Microarrays in Primärtumoren und den mittels qRT-PCR in korrespondierenden Tumor-Zelllinien gemessenen relativen mRNA Expressionshöhen [58].

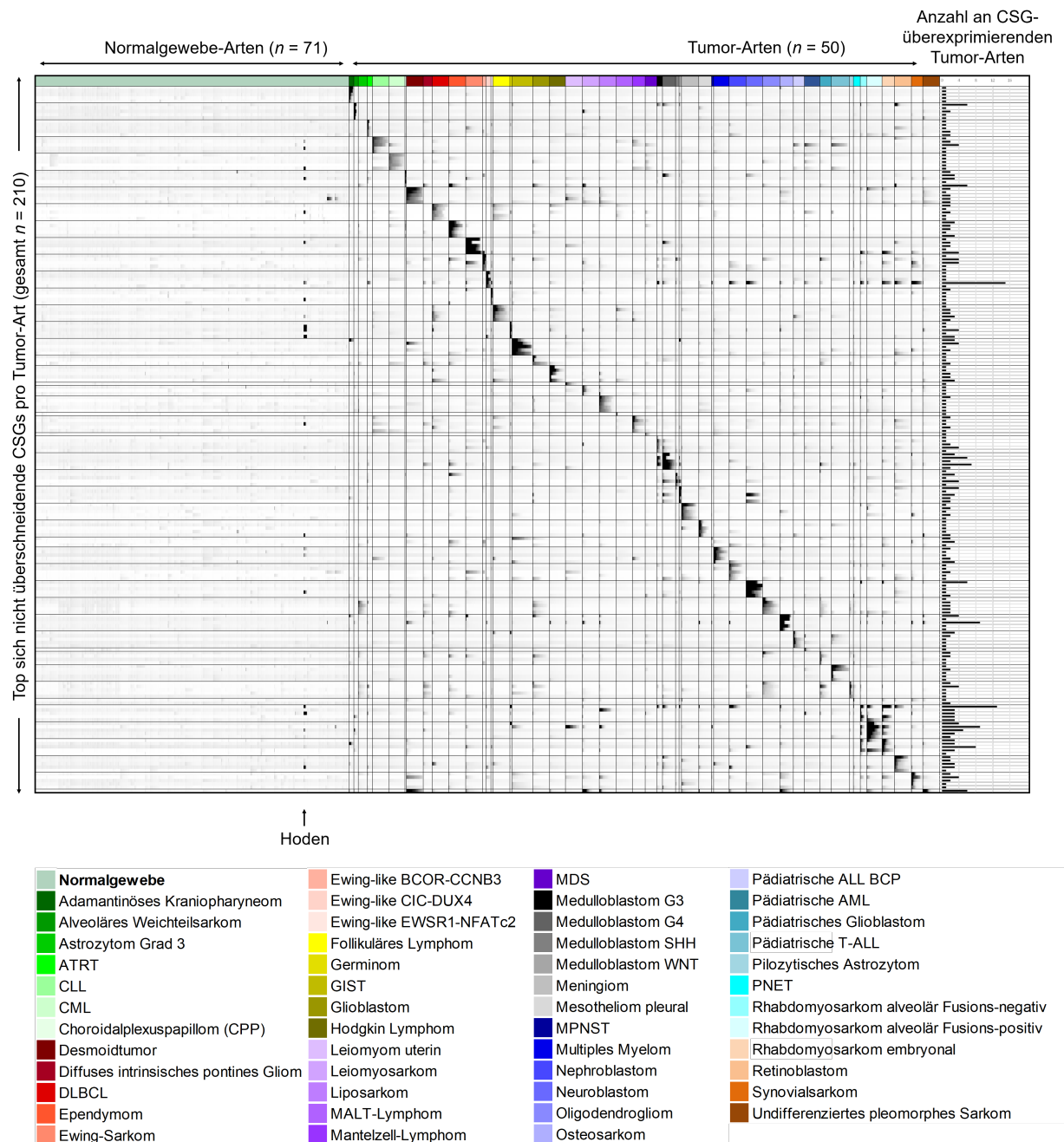


Abbildung 4.2: Überexprimierte CSGs in multiplen Tumorarten. Die relative Genexpressions-Intensität der besten 5 CSGs jeder untersuchten Tumorart wird in Graustufen dargestellt. CSGs die bei mehreren Tumorarten unter den besten 5 sind werden nur einmal dargestellt. Schwarz bedeutet hohe und weiß geringe Expression. Jede Zeile repräsentiert ein CSG, jede Spalte eine Probe eines Primärtumors bzw. eines Normalgewebes. Die Balken rechts zeigen die Anzahl an verschiedenen Tumorarten und die obige Farbkodierung die genauen Tumorarten, in denen das entsprechende CSG einen CSG-Score über der 99,9. Perzentile aller CSG-Scores erreicht hat. Abbildung in Anlehnung an Baldauf et al. [58]

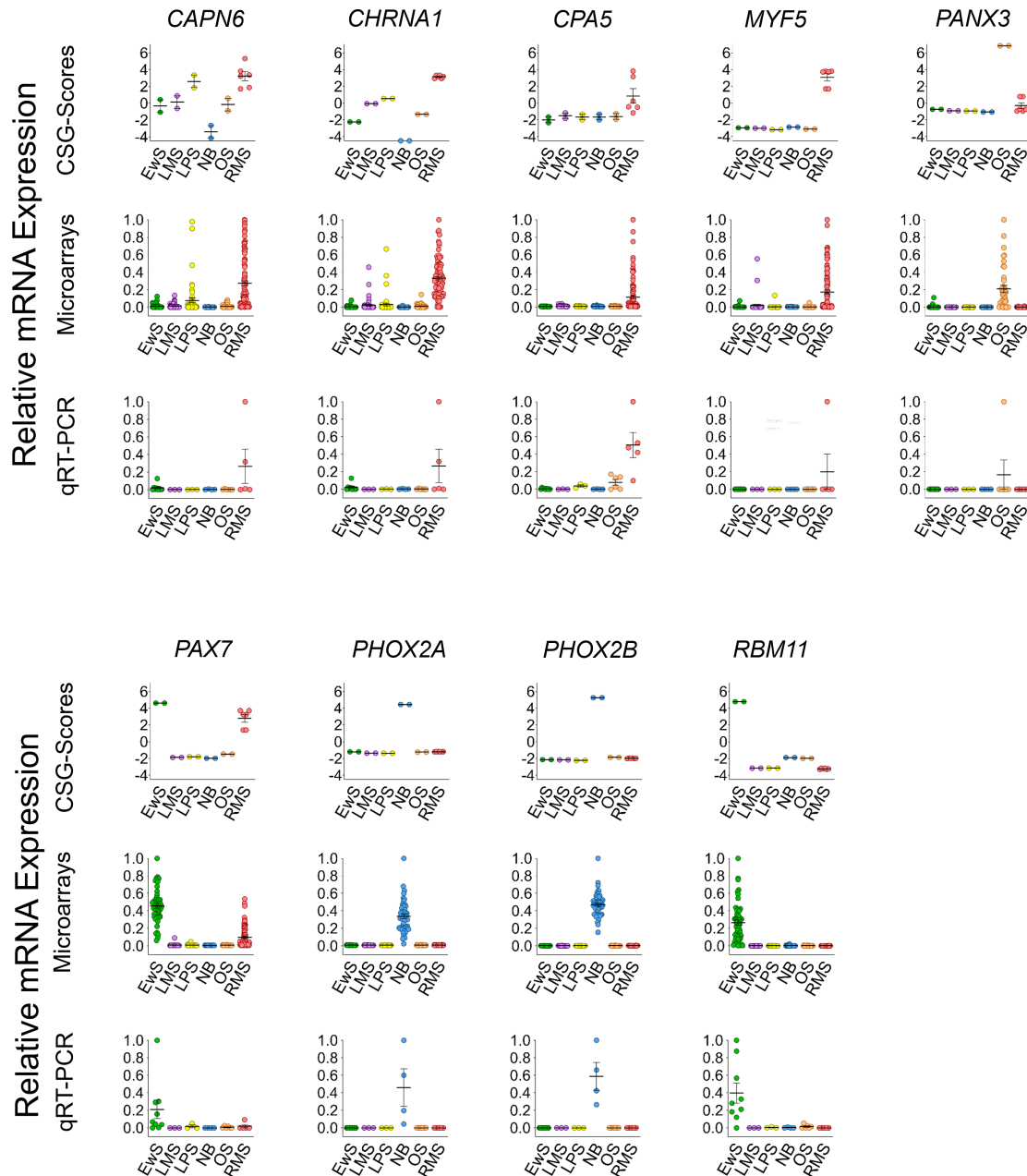


Abbildung 4.3: Validierung der Expressionsmuster ausgewählter CSGs auf mRNA-Ebene. Jeweils obere und mittlere Zeile: CSG-Scores (oben) und korrespondierende Microarray-Expressionsintensitäten (mittlere Zeile) ausgewählter Gene in primären Ewing-Sarkomen (EwS, $n = 50$), Neuroblastomen (NB; $n = 49$), Rhabdomyosarkomen (RMS; $n = 101$), Liposarkomen (LPS; $n = 50$), Leiomyosarkomen (LMS; $n = 50$) und Osteosarkomen (OS; $n = 40$). Jeweils untere Zeile: Relative durch qRT-PCR bestimmte Expressionshöhe des jeweiligen Gens in EwS ($n = 9$), NB ($n = 4$), RMS ($n = 5$), LPS ($n = 3$), LMS ($n = 3$) und OS ($n = 6$) Zelllinien. Abbildung in Anlehnung an Baldauf et al. [58].

4.3.3 Validierung der spezifischen Überexpression des CSGs PAX7 auf Proteinebene mit IHC

PAX7 (paired box 7) weist einen sehr hohen CSG Score (> 4) in mehreren verschiedenen Tumorarten inklusive der oligomutierten Ewing-Sarkome auf. Wir validierten die in-silico starke Überexpression auf Proteinlevel in einem Teil dieser Tumorarten. Dazu nutzten wir einen umfangreichen TMA (Gewebs-Microarray, $n = 409$ Proben), der auch Normalgewebe von somatischen Geweben und Keimzellgewebe enthält. Wie die Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen, ist PAX7 spezifisch nur in Tumorarten mit hohen CSG-Scores für PAX7 exprimiert, während wir keine Expression in allen untersuchten Normalgewebearten feststellen konnten [58].

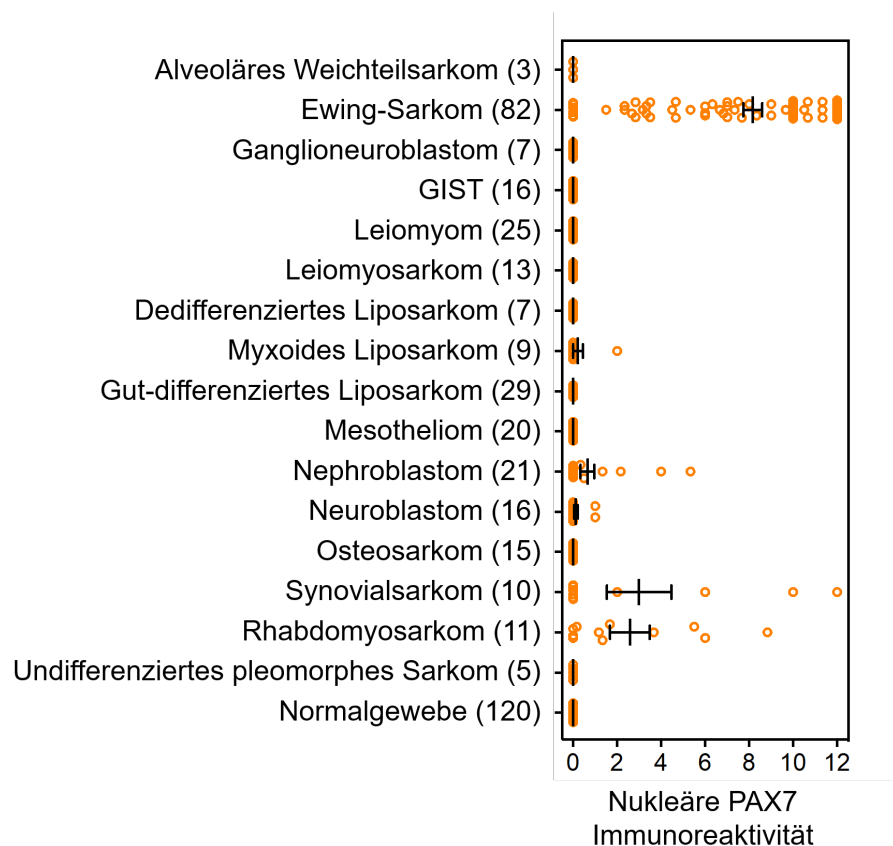


Abbildung 4.4: Analyse der immunhistochemischen nukleären PAX7 Immunoraktivität in Primärtumoren und Normalgeweben. Die Anzahl der untersuchten Proben ist in Klammern angegeben. Abbildung in Anlehnung an Baldauf et al. [58].

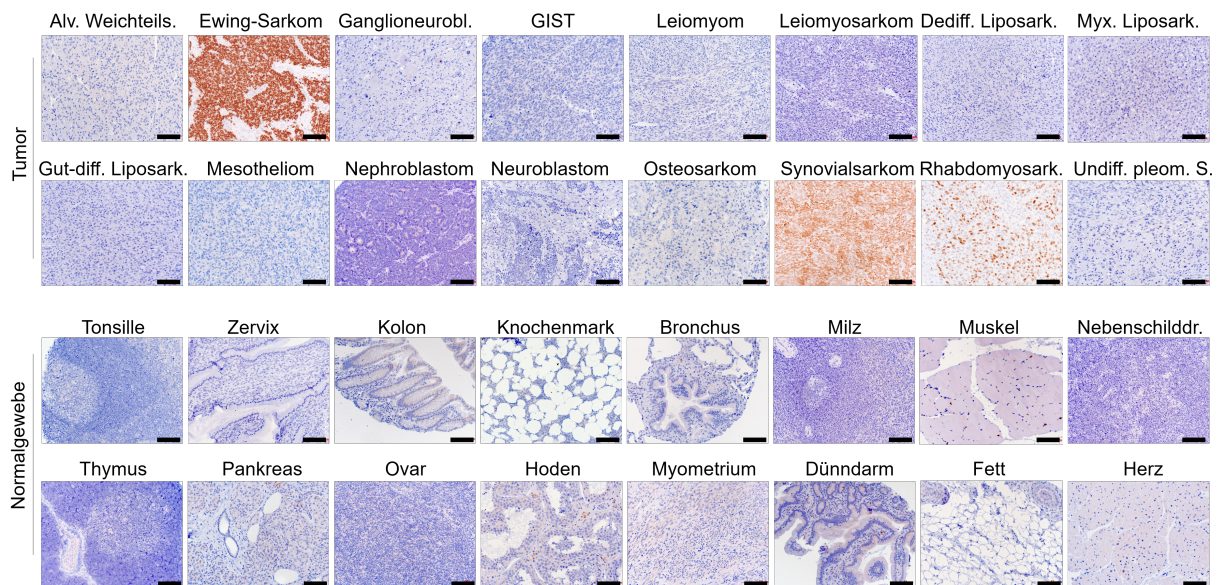


Abbildung 4.5: Validierung der Expressionsmuster ausgewählter CSGs auf Proteinebene mittels Immunhistochemie. Repräsentative Bilder der nukleären immunhistochemischen PAX7 Färbung von Tumor- und ausgewählten Normalgewebeprobe. Maßstabsbalken = 300 μ m. In renalen proximalen Tubuli wurde unspezifische zytoplasmatische Anfärbung beobachtet, während die Zellkerne alle keine PAX7 Immunoreaktivität zeigten. Diese unspezifische zytoplasmatische Anfärbung wurde bereits früher bei dem verwendeten anti-PAX7-Antikörper berichtet [100]. Abbildung in Anlehnung an Baldauf et al. [58].

Alv. Weichteils.	Alveoläres Weichteilsarkom
Ganglioneurol.	Ganglioneuroblastom
Dediff. Liposark.	Dedifferenziertes Liposarkom
Myx. Liposark.	Myxoides Liposarkom
Gut-diff. Liposark.	Gut-differenziertes Liposarkom
Rhabdomyosark.	Rhabdomyosarkom
Undiff. pleom. S.	Undifferenziertes pleomorphes Sarkom
Nebenschilddr.	Nebenschilddrüse

4.4 Identifizierung CSG-spezifischer Peptide mit hoher MHC-Affinität

4.4.1 Bioinformatische Vorhersage hochaffiner CSG-spezifischer Peptide

CSG-kodierte Peptide, die für eine gezielte Immuntherapie geeignet sind, benötigen eine hohe Affinität zu MHC-I, damit sie von den Zellen präsentiert werden. Damit ein Peptid von einem MHC-I-Molekül gebunden und damit präsentiert wird, ist zum einen die Über-

expression des Epitops als auch die Antigenprozessierung wichtig [14]. So muss ein Protein intrazellulär in Peptide zersetzt werden, diese müssen über den TAP-Transporter ins Endoplasmatische Retikulum gelangen um dort auf die MHC-I-Moleküle geladen zu werden. Die Menge eines Peptids kann zum einen indirekt über die Expression des zugrundeliegenden Gens geschätzt werden. Dies ist die aktuell am häufigsten und auch von uns verwendete Methode [14]. Alternativ wird in Zukunft auch die genaue Bestimmung der Menge eines Peptids auf der Zelloberfläche durch Massenspektrometrie möglich sein. Diese Technik ist derzeit noch durch eine eingeschränkte Sensitivität sowie den Bedarf an großen Mengen an Tumorzellmaterial limitiert [14]. Die meisten Studien weisen darauf hin, dass Zielepitope einer natürlich auftretenden Immunantwort gegen Tumor-Neoantigene fast ausschließlich Peptide sind, für die bioinformatisch eine hohe Affinität zu MHC-I vorhergesagt wurde [14, 101, 102, 103]. Wir verwendeten für die bioinformatische Prädiktion solcher hochaffiner Peptide NetMHC [73, 84], dessen Funktionsweise im Methodenteil genauer beschrieben ist.

Insgesamt gibt es etwa 2500 MHC-I-Allele, wovon humane Zellen 6 verschiedene exprimieren können [14]. Wir konzentrierten uns auf MHC-I-Moleküle, da die Affinität von Peptiden hierzu aufgrund der geschlossenen Peptid-Bindungsgrube gut vorhergesagt werden kann, während dies für MHC-II-Moleküle aufgrund der offenen Bindungsgrube bisher noch sehr eingeschränkt möglich ist [14]. HLA-A02:01 ist mit einer Allelfrequenz von 0,2755 [77] das häufigste MHC-I-Allel in Kaukasiern[78], weshalb wir uns hier auf HLA-A02:01 fokussieren.

In unserer Liste von 806 CSGs suchten wir nach Peptiden mit einer Länge von neun Aminosäuren, da diese zu den meisten MHC-Klasse-I-Molekülen die höchste Affinität zeigen [58, 73, 75]. Diese Peptide wurden dann mithilfe von Uniprot (UniProt release 2015.06) [104] mit dem humanen Referenzproteom abgeglichen, um Sequenzidentität mit einem Peptid aus einem anderen möglicherweise unspezifisch exprimierten Protein zu vermeiden. Insgesamt konnten wir 7247 9mer-Peptide mit als hoch prädizierter MHC-Affinität (definiert als Dissoziationskonstante $Kd \leq 150$ nM) identifizieren, wovon 6589 keine Sequenzidentität mit anderen Proteinen hatten [58].

4.4.2 In-vitro-Validierung der prädizierten hohen MHC-Affinität

Wir konnten die in-silico prädizierte Affinität von Peptiden zu humanen HLA-A02:01 daraufhin auch in-vitro validieren. Hierfür wählten wir aus den 6589 Peptiden 79 Peptide mit hohen bis sehr hohen zugrundeliegenden CSG-Scores und einer von NetMHC vorhergesagten MHC-Affinität mit einer $Kd \leq 150$ nM aus, die alle untersuchten Tumorarten außer pädiatrische ALL-BCP and pädiatrische AML abdeckten. Für diese 79 Peptide analysierten Andreas Kirschner und Uwe Thiel, wie gut sie dazu in der Lage waren, MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche von TAP-defizienten Zellen im T2-Peptidbindungsversuch zu stabilisieren. Wie in Abbildung 4.6 demonstriert, erreichten 38 der 79 getesteten Peptide (48,1%) bei einer Dosis von 100 μ M mindestens 50% des MHC-stabilisierenden Effekts eines hoch immunogenen Influenza Peptids (GILGFVFTL, [63]), das als Positivkontrolle verwendet wurde. Die relativen Affinitäten der getesteten Peptide sowie das zugrundeliegende CSG

können auch Tabelle 4.1 entnommen werden [58]. Für 16 hochaffine CSG-kodierte Peptide wiederholten wir die T2-Versuche mit sechs verschiedenen Peptid-Konzentrationen (0,1 bis 100 μM), dargestellt in Abbildung 4.7. Interessanterweise zeigten manche, darunter auch ein von PAX7 kodiertes Peptid, eine ähnliche MHC-stabilisierende Kinetik wie das als Positivkontrolle verwendete Influenzaeptid [58].

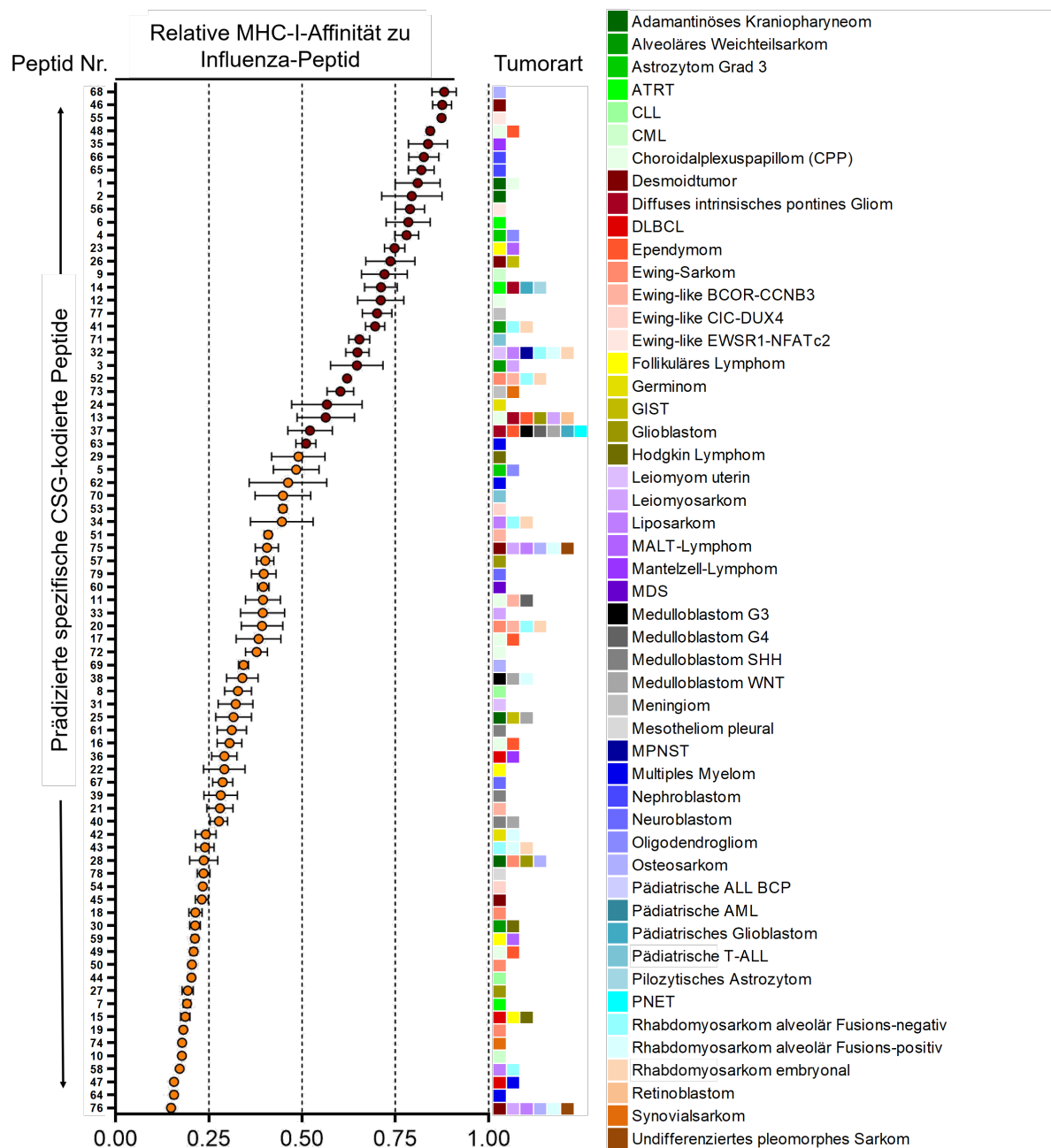


Abbildung 4.6: Affinitäten verschiedener Peptide zu MHC-I im T2-Peptidbindungsversuch. Dargestellt ist die MHC-I-Affinität von 79 ausgewählten Peptiden bei 100 μ M im T2-Bindungsversuch relativ zu einem hochaffinen Influenza-Peptid (die Peptidsequenzen sind in Tabelle 3.5 oder Tabelle 4.1 zu finden). Die farbigen Kästen rechts zeigen die Tumorarten, in denen das jeweils entsprechende CSG überexprimiert ist. Peptide mit einer MHC-Affinität von $\geq 50\%$ des Influenza-Peptids sind in roter Farbe hervorgehoben. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts von $n \geq 3$ Experimenten dargestellt. Abbildung in Anlehnung an Baldauf et al. [58].

Tabelle 4.1: Peptidaffinitäten [58]

Peptid-Nr.	Gen	Peptidsequenz	Relative MHC-I-Affinität	Tumorarten mit Überexpression
68	PANX3	AIYTILVPV	0,881	Osteosarkom
46	C1QTNF6	FLLMCEIPM	0,875	Desmoidtumor
55	EMILIN3	ILDSLVAEV	0,874	Ewing-like EWSR1-NFATc2
48	CCDC114	SLADAALLV	0,843	CPP, Ependymom
35	GEN1	YLPKGVPGV	0,837	Mantelzell-Lymphom
66	CNTN5	SLIDGTFII	0,827	Nephroblastom
65	LYPD1	FIVNCTVNV	0,82	Nephroblastom
1	AMBN	FTLEFDSPV	0,81	ACP, CPP
2	AMELX	MLPDLTLEA	0,794	ACP
56	EMILIN3	GLLEGLETL	0,789	Ewing-like EWSR1-NFATc2
6	LRAT	LILGVIVKV	0,785	ATRT
4	DLL3	LLFPYPSSI	0,78	Astrozytom, Oligodendrogliom
23	GPR82	SIFKPIFYV	0,748	Follikuläres Lymphom, MALT-Lymphom
26	F2RL2	FILKQEYYL	0,737	Desmoidtumor, GIST
9	FUT4	SLASYLLFL	0,721	CML
14	BRINP3	SLHCWVLAV	0,711	ATRT, Diffuses intrinsisches pontines Gliom, Pädiatrisches Glioblastom, Pilozytisches Astrozytom
12	SLC13A4	ILMTVLWFT	0,711	CPP
77	SPTLC3	MLDTVLEAL	0,701	Meningiom
41	MYF5	GMPECNSPV	0,696	Alveoläres Weichteilsarkom, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-negativ, Rhabdomyosarkom embryonal
71	SRY	HQLGHLPPi	0,653	Pädiatrische T-ALL
32	CAPN6	RLFCDPTFL	0,648	Leiomyom uterin, Liposarkom, MPNST, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-negativ, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-positiv, Rhabdomyosarkom embryonal
3	ABCB5	FLILSIAPV	0,647	Alveoläres Weichteilsarkom, Leiomyosarkom
52	PAX7	GLVSSISRV	0,621	Ewing-Sarkom, Ewing-like BCOR-CCNB3, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-negativ, Rhabdomyosarkom embryonal
73	BMP5	FLWSCWVLV	0,603	Meningiom, Synovialsarkom

24	KHDC3L	GMSQILIHV	0,567	Germinom
13	RPE65	HLFDGQALL	0,564	CPP, Diffuses intrinsisches pontines Gliom, Ependymom, Glioblastom, Leiomyosarkom, Retinoblastom
37	DRAXIN	SLAPTMFFL	0,521	Diffuses intrinsisches pontines Gliom, Ependymom, Medulloblastom G3, Medulloblastom G4, Medulloblastom WNT, Pädiatrisches Glioblastom, PNET
63	MAGEC1	FQSSLQSPV	0,51	Multiples Myelom
29	IL9	LLAMVLTSA	0,49	Hodgkin Lymphom
5	BCAN	FLWSDGVPL	0,484	Astrozytom, Oligodendrogliom
62	MAGEC1	AMLKNTVPPI	0,462	Multiples Myelom
70	SRY	KMLPKNCSL	0,449	Pädiatrische T-ALL
53	SYCP2	KMSEASMIV	0,448	Ewing-like CIC-DUX4
34	FRS2	IMQNNSINV	0,446	Liposarkom, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-negativ, Rhabdomyosarkom embryonal
51	CCNB3	KMSTINEAV	0,409	Ewing-like BCOR-CCNB3
75	OLFML2B	ALMEAMHTV	0,406	Desmoidtumor, Leiomyosarkom, Liposarkom, Osteosarkom, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-positiv, Undifferenziertes pleomorphes Sarkom
57	LANCL2	MLMQPAAKV	0,401	Glioblastom
79	GPR22	ALICCFHEA	0,397	Neuroblastom
60	cxorf21	VLQTNPNPV	0,396	MDS
11	GRM8	LLSNITLGV	0,395	CPP, Ewing-like BCOR-CCNB3, Medulloblastom G4
33	SPINK13	LVCSTLTHV	0,394	Leiomyosarkom
20	PAX7	QLAAFNHLL	0,393	Ewing-Sarkom, Ewing-like BCOR-CCNB3, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-negativ, Rhabdomyosarkom embryonal
17	CCDC39	SLMTKINEL	0,383	CPP, Ependymom
72	AJAP1	FQLAVDLPA	0,378	CPP
69	PANX3	ALSSDLLFI	0,343	Osteosarkom
38	NTN5	RLAVRVLAV	0,34	Medulloblastom G3, Medulloblastom WNT, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-positiv
8	CCDC141	VLQTYVAFL	0,328	CLL
31	PRLHR	GLIVLLYSV	0,322	Leiomyom uterin
25	DKK4	WLCSPGLAL	0,316	ACP, GIST, Medulloblastom WNT
61	FOXR2	YQSQKLWQI	0,312	Medulloblastom SHH

16	TCTEX1D1	FALANVYAV	0,306	CPP, Ependymom
36	EML6	FLIRLVAKA	0,292	DLBCL, Mantelzell-Lymphom
22	IGHE	SLNGTTMTL	0,291	Follikuläres Lymphom
67	PHOX2B	SLGGPFASV	0,287	Neuroblastom
39	FOXR2	ILAKYRVGV	0,282	Medulloblastom SHH
21	CCNB3	KLAAASLLL	0,28	Ewing-like BCOR-CCNB3
40	SP5	FLQDRTPSA	0,277	Medulloblastom SHH, Medulloblastom WNT
42	ERVW-1	FVSSRIEAV	0,242	Germinom, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-positiv
43	MYH3	RLLAHLYAT	0,239	Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-negativ, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-positiv, Rhabdomyosarkom embryonal
28	IBSP	KTALILLSI	0,237	ACP, Ewing-Sarkom, Glioblastom, Osteosarkom
78	PTGIS	AMYTNLHAV	0,236	Mesotheliom pleural
54	SYCP2	KMSESVSSL	0,234	Ewing-like CIC-DUX4
45	LRRC15	SLIINVNV	0,231	Desmoidtumor
18	LIPI	KLLNQLGMI	0,214	Ewing-Sarkom
30	IL26	LLVTLSLAI	0,213	Alveoläres Weichteilsarkom, Hodgkin Lymphom
59	GPR82	VLTSYYSFV	0,212	Follikuläres Lymphom, MALT-Lymphom
49	CCDC114	FINEQNLEL	0,209	CPP, Ependymom
50	LIPI	TMMDGSFSF	0,205	Ewing-Sarkom
44	CCDC141	SLHISSYGV	0,203	CLL
27	LANCL2	GMAGAIHFL	0,193	Glioblastom
7	RIPPLY3	GAFGFQHPV	0,192	ATRT
15	PLA2G2D	GILNLNKMV	0,187	DLBCL, Follikuläres Lymphom, Hodgkin Lymphom
19	RBM11	YAIALLNGI	0,182	Ewing-Sarkom
74	HMGCLL1	QLSGLPEFV	0,178	Synovialsarkom
10	PRTN3	LLLSGAARA	0,177	CML
58	MDM2	HLMACFTCA	0,172	Liposarkom, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-negativ
47	CCR10	GLYSASFHA	0,156	DLBCL, Multiples Myelom
64	GPRC5D	IMTRGMMFV	0,156	Multiples Myelom
76	OLFML2B	VLYFALIVV	0,149	Desmoidtumor, Leiomyosarkom, Liposarkom, Osteosarkom, Rhabdomyosarkom alveolär Fusions-positiv, Undifferenziertes pleomorphes Sarkom

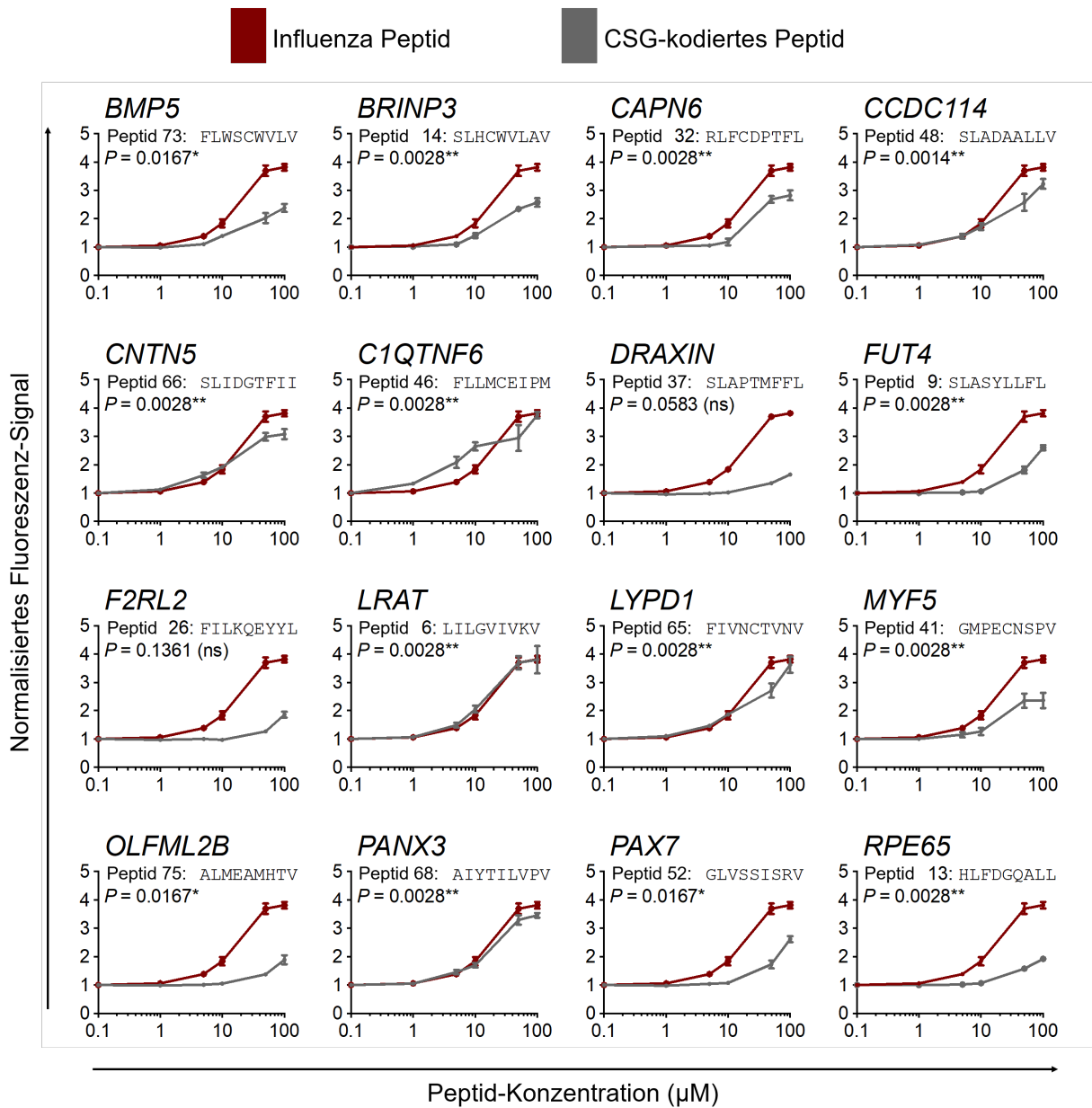


Abbildung 4.7: Titration T2-Peptidbindungsversuch. Normalisierte Fluoreszenzsignale von 16 ausgewählten Peptiden mit hoher MHC-Affinität bei verschiedenen Peptid-Konzentrationen im Vergleich zur Affinität eines hochaffinen Influenza-Peptids im T2-Peptidbindungsversuch. Die Daten werden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts von $n \geq 3$ Experimenten dargestellt. Die P-Werte einer Spearman-Korrelation werden bei jedem Peptid angegeben. Abbildung in Anlehnung an Baldauf et al.[58].

4.5 RAVEN

Um die von uns entwickelten und validierten Algorithmen zur systematischen Identifizierung von CSGs und Vorhersage entsprechender hochaffiner Peptide für ein bestimmtes MHC-Allel zu vereinfachen und zu beschleunigen, entwickelte die Bioinformatikerin Julia Gerke freundlicherweise eine Software inklusive nutzerfreundlicher Graphik namens RAVEN (Rich Analysis of Variable gene Expressions in Numerous tissues). Unter laufenden Anwendungstests durch mich konnte Frau Gerke die Software schließlich Stück für Stück optimieren. Die Software automatisiert ausgehend von einer Tabelle mit Expressiondaten alle in dieser Arbeit entwickelten und beschriebenen Schritte bis zur Ausgabe spezifischer hochaffiner Peptide. Dies ist auch für verschiedene Peptidlängen sowie verschiedene MHC-Moleküle möglich. RAVEN sowie ein detailliertes Handbuch und unsere Genexpressionsdatensets sind frei verfügbar unter <https://github.com/JSGerke/RAVENsoftware> [58].

5. DISKUSSION

5.1 Diskussion der Resultate

Oft können schon heute dauerhafte Therapieansprechen bei Immuntherapien beobachtet werden. Der potenzielle Vorteil einer spezifischen Immuntherapie ist, dass sie weniger begleitende Schäden des normalen Gewebes verursacht als eine herkömmliche Chemo- oder Radiotherapie. Zudem kann sich das Immunsystem kontinuierlich an sich durch neue zusätzliche Mutationen verändernde Tumoren anpassen [14, 58]. Allerdings kann bei verschiedenen Formen der Immuntherapie auch Autoimmunität mit zum Teil schwerem Verlauf ausgelöst werden [14], sowohl bei Immunsystem-stimulierenden oder -regulierenden Ansätzen als auch bei zu unspezifisch gewählten Zielstrukturen oder Kreuzreaktionen.

Diese Arbeit bietet eine große Ressource mit CSGs inklusive spezifischer MHC-I-affiner Peptide als Zielstruktur für eine T-Zell-gerichtete Immuntherapie für 50 verschiedene Tumorarten mit einem Fokus auf Sarkomen und pädiatrischen Tumoren. Mittlerweile sind online unter <https://github.com/JSGerke/RAVENsoftware> [58] auch normalisierte Microarray-Datensätze inklusive der zugehörigen CSGs und Peptide für 19 Karzinom-Entitäten (1462 Proben) verfügbar. Zudem bietet das hierbei in Zusammenarbeit mit Julia Gerke entstandene Programm RAVEN die Möglichkeit, schnell und einfach für neue Microarray-Datensätze und damit auch für weitere Tumorarten CSGs und die entsprechenden hochaffinen spezifischen Peptide vorherzusagen [58]. Dies beschleunigt die weitere Suche nach geeigneten Zielstrukturen für adoptive T-Zell-Therapien enorm. Unsere Validierungen der Überexpression der identifizierten CSGs zeigten eine gute Übereinstimmung zwischen den Microarray-Expressionsdaten, den darauf basierenden CSG-Scores und der Expressionshöhe in Tumorzelllinien (qRT-PCR) und in Gewebeproben (IHC). Auch weiterführende Fragestellungen, die über unsere Studie hinausgehen, können mit der von uns entwickelten Software RAVEN untersucht werden. So könnte man beispielsweise diagnostische Biomarker für eine Tumorart identifizieren. Unter Hinzunahme weiterer Datensätze kann RAVEN auch für die Suche nach Autoantikörper-Signaturen, Zielstrukturen für Tumorimpfstoffe oder Membran-Antigen-Zielstrukturen verwendet werden [58].

Um Nebenwirkungen durch sogenannte Off-target-Effekte zu verhindern, ist bei adoptiven T-Zell-Therapien die Auswahl eines geeigneten, sehr spezifischen Zielobjekts entscheidend. Das Peptid, gegen welches der TCR des adoptiven T-Zell-Transfers gerichtet

ist, sollte im Optimalfall ausschließlich auf Tumorzellen vorkommen und sollte zusätzlich für einen guten Therapieerfolg im Optimalfall auch auf jeder einzelnen Tumorzelle auf der Zelloberfläche auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Die perfekte Zielstruktur wird nur sehr selten zu finden sein. Oft sind Tumore sehr heterogen, insbesondere solide Tumore [38]. Und wenn eine ubiquitär auf den Tumorzellen exprimierte Zielstruktur gefunden wird wie z.B. CD19 bei einer CAR-Therapie bei B-ALL [38], dann ist diese Zielstruktur oft nicht spezifisch, im vorliegenden Fall beseitigt die Therapie zum Beispiel auch alle normalen B-Lymphozyten, da diese CD19 tragen. Deshalb müssen kleine Abweichungen von der „perfekten Zielstruktur“ in Kauf genommen werden, solange dies zu keinen schwerwiegenden Nebenwirkungen führt. Im Beispiel der CD19-CAR-Therapie bei B-ALL konnten sehr gute Remissionsraten erzielt werden [38, 42, 43]. Nebenwirkung war natürlich eine Immunsuppression durch die Beseitigung der normalen B-Lymphozyten, allerdings führte dies in der vorliegenden Studiengruppe zu keinen lebensbedrohlichen Komplikationen [38]. Eine andere Möglichkeit einer nicht schwerwiegenden Abweichung von der perfekten Zielstruktur ist es, eine sehr niedrige Expression in Normalgeweben zu akzeptieren, wenn die Tumorzellen das zugrundeliegende CSG stark überexprimieren. Dies ist Bestandteil unseres RAVEN-Algorithmus [58]. In der Annahme, dass die CSG-spezifischen T-Zellen dann vor allem die Tumorzellen erkennen, konnten schon Studien mit adoptiven T-Zell-Transfers mit transgenen TCRs gegen überexprimierte Gene einen Rückgang des Tumors ohne begleitende schwerwiegende Nebenwirkungen zeigen [53]. Allerdings ereigneten sich in anderen Studien zum Teil auch schwerwiegende Komplikationen durch Kreuzreaktionen bis hin zum Tod [51]. Mögliche Kreuzreaktionen der T-Lymphozyten sind aktuell noch schwer vorhersehbar [50, 51].

Unter den von uns identifizierten CSGs fanden sich signifikant ($P < 0,0001$, Chi2-Test) viele bekannte Cancer-testis-Antigene (CTDatabase, www.cta.lncc.br [105]), jedoch auch viele andere Gene, die in Relation zu allen untersuchten Normalgeweben eine starke Überexpression in einer der Tumorarten zeigten [58]. Hierunter fand sich auch PAX7, welches wir detaillierter untersuchten. Das CSG PAX7 kodiert ein Paired-Box-Protein, welchem eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Satellitenzellen der Muskulatur und damit der Regenerierung der Skelettmuskulatur [106] sowie in der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems [62] zukommt [58]. In einem Großteil der alveolären Rhabdomyosarkome findet sich eine ursächliche Translokation von PAX7 oder PAX3, was eine Beteiligung von PAX7 an der Entstehung von myogenen Tumoren nahelegt [58, 107]. In unserer Analyse zeigte sich PAX7 als stark überexprimiertes CSG in mehreren Tumorarten (Ewing-Sarkom, Ewing-like Sarkome mit BCOR-CCNB3-Translokation, ERMS, translokationsnegative ARMS), die allesamt als oligomutiert gelten. Die spezifische hohe Expression konnten wir auf Proteinebene durch IHC bestätigen. Zudem konnten wir mit GLVSSISRV ein Peptid aus PAX7 identifizieren, welches ausschließlich in PAX7 vorkommt und zudem eine sehr hohe Affinität zu HLA-A02:01 in der bioinformatischen Affinitätsprädiktion zeigte. Wenn es durch weitere Forschungsarbeit gelingt, einen TCR gegen GLVSSISRV zu identifizieren, könnte PAX7 als Zielstruktur für eine adoptive T-Zell-Therapie gegen vier verschiedene Sarkomentitäten dienen [58].

5.2 Limitationen und Perspektiven

Selbstverständlich unterliegt die vorliegende Arbeit bzw. die Nutzung von RAVEN zur Identifizierung spezifischer Zielstrukturen für eine Immuntherapie auch einigen Limitationen, die in der Zukunft noch überwunden werden müssen.

So ist eine sorgfältige Auswahl der verwendeten Genexpressions-Microarrays essentiell. Die Annotationen müssen gründlich geprüft werden und Qualitätskontrollen unterzogen werden. So kann ein Großteil schlecht aufbereiteter Microarrays herausgefiltert werden, letztlich bleibt jedoch immer ein Restrisiko, dass das verwendete Zellmaterial durch andere Zellen kontaminiert war oder schlecht aufbereitet war. Dadurch kann es zu Verfälschungen der wahren Expressionsdaten kommen.

Auch ist es kaum möglich, alle Normalgewebe-Arten in der Analyse zu berücksichtigen. Dafür dürfte man beispielsweise nicht normales Lebergewebe verwenden, sondern müsste dieses in die einzelnen Zellpopulationen zerlegen, damit man einen Microarray mit ausschließlich Ito-Zellen ohne Hepatozyten hätte. Die Microarrays müssten sämtliche vorhandene Zellpopulationen und keine Gewebe abbilden. Auch unsere Validierung bezüglich der Spezifität der identifizierten Proteine kann nicht alle Normalgewebe bzw. alle normalen Zellarten abdecken. Hierfür würde zum Beispiel noch Hirngewebe benötigt, wo alle verschiedenen Zellarten evaluiert werden müssten. Auch Leukozyten in all ihren Formen und Entwicklungsstadien müssten berücksichtigt werden sowie viele weitere Zellen. Insgesamt deckt unsere Analyse mit 71 verschiedenen Normalgewebearten jedoch ein sehr weites Spektrum ab, sodass Kreuzreaktionen von CSG-basierten Therapien gegen die meisten Zellarten des menschlichen Körpers als unwahrscheinlich erscheinen. Sobald detailliertere Microarray-Daten mit Zellpopulationen statt Gewebeproben zur Verfügung stehen, kann die Auswahl an spezifischen Zielstrukturen für eine Immuntherapie dank RAVEN automatisiert schnell aktualisiert werden.

Zudem sind Kreuzreaktionen bisher schwer präzifizierbar [50, 51]. In Zukunft wird durch weitere Forschungsarbeit das Verständnis der Interaktion zwischen TCR und Zielstruktur noch deutlich verbessert werden. Dadurch werden Kreuzreaktionen besser vorhersehbar und damit auch vermeidbar werden. Zudem werden auf Basis neuer Forschungsergebnisse weitere Aktualisierungen der Datenbanken UniProt und Net-MHC folgen, wodurch die Identifikation von Peptiden weiter an Spezifität gewinnen wird.

Eine weitere Limitation dieses Projektes ist, dass unsere bisherigen Validierungen der Spezifität der identifizierten CSGs ausschließlich retrospektiv waren. Zur Komplettierung der Validierung wäre es wünschenswert, die Spezifität einzelner CSGs sowie deren Überexpression auch prospektiv zu untersuchen. Die immunhistochemische Validierung der spezifischen Expression erfolgte bisher nur für ein einziges Protein (PAX7), dies sollte noch für viele weitere Proteine erfolgen, um die Verlässlichkeit unseres Algorithmus zu bestätigen.

Hierfür allerdings müssen zuerst spezifische Antikörper für die zu testenden CSGs gefunden werden und die Spezifität der Antikörper nachgewiesen werden.

Wir haben auf der Suche nach Zielstrukturen für eine T-Zell-vermittelte Immuntherapie nur nach MHC-I-präsentierten Peptiden gesucht. Viele zusätzliche Zielstrukturen können noch in Genfusionsprodukten, mistranslatierten Proteinen oder auch bei den MHC-II-bindenden Peptiden gefunden werden. Im Moment basieren adoptive T-Zell-Therapien vor allem auf MHC-I-gebundenen Peptiden als Zielstruktur und entsprechend auf CD8+ T-Zellen. Da die Bindungsgrube für das Peptid bei MHC-I-Molekülen geschlossen ist, ist die Affinität von Peptiden verschiedener Längen zu den jeweiligen MHC-I-Molekülen relativ gut bioinformatisch vorhersagbar [14]. Für MHC-II ist die Affinitätsprädiktion zu Peptiden bisher noch unzuverlässig, da die Peptid-Bindungsgrube offen ist und dadurch viel mehr Spielraum in der Bindung von Peptiden zulässt [14]. Durch weitere Forschung und verbesserte bioinformatische Algorithmen zur Affinitätsvorhersage werden in Zukunft jedoch auch MHC-II-gebundene Peptide als Zielstruktur für CD4+ T-Zellen an Bedeutung zunehmen [14].

Wir haben bisher nur die Peptidsequenzen von möglichen Zielstrukturen identifiziert, nicht jedoch die entsprechenden TCRs und ihre Sequenzen. Man müsste Blutproben auf spezifische T-Zellen scannen, um die spezifischen TCRs identifizieren und letztlich klonen zu können. Dies ist sehr aufwendig. Allerdings ist dies der nächste wichtige große Schritt zur Translation unserer Ergebnisse zur klinischen Anwendung einer T-Zell-basierten Immuntherapie gegen unsere spezifischen Zielstrukturen. Für die Zukunft gibt es auch das Konzept der personalisierten Immuntherapie mit „off-the-shelf“-TCRs [52, 108, 109, 110]. Man stelle sich eine Art Bibliothek vor, in welcher die Sequenzen für TCRs gegen verschiedenste CSG-spezifische Peptide gelagert bzw. gespeichert sind. Man könnte dann bei einem neuen Tumorpatienten nach überexprimierten Genen suchen, zum Beispiel unter Zuhilfenahme von Genexpressions-Microarrays oder mittels Testung auf häufig überexprimierte Gene der jeweiligen Tumorart. Mit der Kenntnis der HLA-Gruppe des Patienten könnte man – zum Beispiel mit RAVEN – CSG-spezifische Peptide mit einer hohen Affinität zu den MHC-Molekülen des Patienten bestimmen. Dann würde man aus der TCR-Bibliothek den fertig bereitstehenden TCR gegen das bei dem Patienten geeignete Peptid aus dem Regal nehmen und in die transgenen T-Zellen des Patienten klonen. Bis eine solche umfangreiche Bibliothek existieren wird, wird es sicher noch einige Zeit dauern. Unter anderem müssten hierfür die Sequenzen von vielen CSG-spezifischen TCRs identifiziert und geklont werden. Es existieren jedoch schon einige Arbeiten hierzu, die beispielsweise zur Therapie von B-Zell-Malignomen TCRs gegen CD20 für verschiedene HLA-Typen identifiziert haben [108]. Um viele CSG-spezifische TCRs für eine solche Bibliothek zu identifizieren, bietet diese Arbeit eine wertvolle Hilfestellung und Beschleunigung.

Zudem muss weiter untersucht werden, wofür die spezifischen CSGs oder die durch sie kodierten Peptide außer als Zielstruktur für Immuntherapien noch genutzt werden können. Für manche CSGs konnten keine geeigneten Peptide gefunden werden. Die Identifikation solcher CSGs kann trotzdem wertvoll sein, da beispielsweise ihre Genprodukte mit konven-

tionellen Pharmakotherapeutika moduliert werden können. So gibt es spezifische Inhibitoren gegen die CSGs FGFR4 (Rhabdomyosarkom), CDK4 (Liposarkom) und verschiedene MMPs (Demoid, Leiomyom, Osteosarkom, ACP), die in klinischen Studien eingesetzt wurden [58, 111, 112, 113].

CSGs können auch für einen Einsatz in diagnostischen Verfahren weiter evaluiert werden. So können CSGs, die in multiplen Tumorarten überexprimiert sind, für Tumor-Screenings untersucht werden. CSGs mit spezifischer Überexpression in nur einer Tumorentität hingegen könnten als diagnostische Marker herangezogen werden [58]. Auch muss untersucht werden, ob Subgruppen mit der Expression eines bestimmten CSGs auf eine Therapie besonders ansprechen.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine rein präklinische Studie. Für eine erfolgreiche Translation unserer Ergebnisse zu einer wirksamen Therapie müssen einige weitere Fragen bezüglich der klinischen Anwendung geklärt werden und in klinischen Studien evaluiert werden. Wie sollen verschiedene Ansätze der Immuntherapie kombiniert werden? In welchen Fällen ist eine personalisierte T-Zell-adaptierte Therapie einer Tumorstabilisierung vorzuziehen bzw. hinten anzustellen? Wann sollten Checkpoint-Inhibitoren zur Therapie hinzugefügt werden? Inwiefern schaffen wir es, Immuntherapien zu personalisieren[14]? Einige dieser Fragen werden in einigen Jahren durch die intensive Forschung an Immuntherapien als auch durch das zunehmend bessere Verständnis des Immunsystems und seiner Interaktionen mit Tumorzellen beantwortbar werden [14], zudem sind hierfür umfangreiche klinische Studien nötig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Konventionelle Therapien von Sarkomen und anderen pädiatrischen Tumoren erreichen oft nur bedingten Erfolg trotz hoher Toxizität. Daher werden dringend spezifischere Therapien benötigt. Adoptive T-Zell-Therapien scheinen hier durch ihre Spezifität eine vielversprechende therapeutische Alternative zu sein [58].

Immuntherapie kann die Therapie gegen Malignome nur revolutionieren, wenn spezifische Zielstrukturen zur Verfügung stehen. Als solche könnten sogenannte Neo-Antigene genutzt werden, die bei rekurrierenden somatischen Mutationen im Exom entstehen. Jedoch sind vor allem pädiatrische Tumore oligomutiert und besitzen kaum rekurrierende Mutationen. Umso vielversprechender sind hier Antigene, die von CSGs kodiert werden. Diese sind im Tumor überexprimiert und zeigen kaum Expression in Normalgeweben. Solche immunogenen Peptide können eine gezielte Immuntherapie ermöglichen [58].

Zur Identifizierung solcher spezifischen Zielstrukturen entwickelten wir einen Algorithmus zur bioinformatischen Analyse von DNA-Microarrays und kombinierten diesen mit in vitro und in situ Experimenten, um neue und hochspezifische immunogene Zielstrukturen für viele verschiedene Tumorarten mit dem Schwerpunkt auf humanen Sarkomen und pädiatrischen Tumoren zu identifizieren. Öffentlich verfügbare Genexpressionsdaten, welche 2678 Genexpressions-Microarrays für sowohl 50 Tumorarten mit einem Fokus auf Sarkomen und pädiatrischen Tumoren als auch 71 Normalgewebetypen umfassen, wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen und simultan normalisiert. Mit einem von uns entwickelten Algorithmus suchten wir transkriptomweit in jeder Tumorart nach stark und spezifisch exprimierten geschlechterspezifischen CSGs, die so gut wie keine Expression in Normalgeweben zeigen. Als Proof-of-concept konnten wir bereits etablierte Tumor-assoziierte Antigene wie z.B. LIPI im Ewing-Sarkom oder PRAME im Neuroblastom identifizieren, jedoch auch viele neue Kandidaten, wovon einige als Zielstruktur für mehrere Tumorentitäten geeignet zu sein scheinen [58].

Die spezifische Expression dieser Gene wurde anschließend durch qRT-PCR in Tumor-Zelllinien und durch IHC in TMAs mit 289 Gewebeproben aus 16 Tumorarten und 120 Proben aus 41 Normalgewebetypen validiert [58].

Daraufhin identifizierten wir Peptide, die von CSGs kodiert werden und eine hohe Affinität zu MHC-I-Molekülen zeigen. Dazu nutzten wir Algorithmen zur Vorhersage der Peptid-MHC-Bindungsstärke zu HLA-A02:01. Die als hochaffin vorhergesagten Peptide wurden dann mit Protein-Datenbanken abgeglichen, um eine Sequenz-Gleichheit mit anderen möglicherweise übermäßig exprimierten Proteinen zu verhindern. Die Affinität identi-

fizierter Peptide wurde in einem T2-Peptidbindungsversuch validiert, in dem einige Peptide eine ähnliche Kinetik wie ein hochimmunogenes Influenza-Peptid aufwiesen [58].

Zusammenfassend erstellten wir einen umfassenden, kuratierten und validierten Katalog an tumorspezifischen, hochaffinen und immunogenen Peptiden für 50 Tumorarten. Darüber hinaus entwickelten wir eine benutzerfreundliche Software namens RAVEN (Rich Analysis of Variably Expressed genes in Numerous tissues), die ausgehend von Genexpressionsdaten die systematische und schnelle Identifikation von CSG-kodierten Peptiden mit hoher Affinität zu MHC-Molekülen automatisiert. Dadurch kann unser Algorithmus einfach und schnell auf neue Expressionsdatensets angewandt werden. RAVEN ist unter <https://github.com/JSGerke/RAVENsoftware> [58] zum Download verfügbar. Wir gehen davon aus, dass unsere Daten eine wertvolle Ressource für die Entwicklung weiterer Immuntherapien sind und letztendlich zur Verbesserung des Patientenüberlebens beitragen werden. Diese Daten wurden 2018 in *Oncoimmunology* veröffentlicht [58].

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
ACP	Adamantinöses Kraniopharyngeom
ALL BCP	Akute lymphatische Leukämie prä-B-Zell-Typ
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	American Type Culture Collection
ATRT	Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor
B-ALL	Akute lymphatische Leukämie der B-Zellen
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CDF	Chip Definition Datei
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CPP	Choroidalplexuspapillom
CSG	Tumorspezifisches Gen (engl. für 'cancer-specific gene')
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	Durchflusszytometrie
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Disease
HLA	Humanes Leukozytenantigen-System, Synonym für MHC beim Mensch
HPV	Humane Papilloma Viren
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IEDB	Immune Epitope Database and Analysis Resource
IHC	Immunhistochemie

IQR	Interquartilabstand (engl. für 'inter-quartile range')
Max	Maximum
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
OS	Überexpressions-Score (engl. für 'Outlier Score')
PAP	Prostataspezifische saure Phosphatase
PAX7	Paired-Box-Protein 7
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed death 1
PNET	Primitiver neuroektodermaler Tumor
PS	Straf-Score (engl. für 'Penalty Score')
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Q	Quartil
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
NUSE	Normalized Unscaled Standard Error
RAVEN	Rich Analysis of Variable gene Expressions in Numerous tissues
RNA	Ribonukleinsäure
RLE	Relative Log Expression
RMA	Robust Multichip Average
RMS	Rhabdomyosarkom
STR-profiling	Short tandem repeat profiling
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TAP	Antigenpeptid-Transporter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TMA	Gewebs-Microarray
Treg	Regulatorischer T-Lymphozyt
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	William Coley	2
1.2	CAR-Therapie	6
1.3	Adoptive T-Zell-Therapie	7
3.1	Schematische Darstellung eines Microarrays	21
3.2	Schematische Darstellung eines TMAs	27
3.3	T2-Peptidbindungsversuch	29
4.1	Übersicht über den Projektablauf	32
4.2	Überexprimierte CSGs in multiplen Tumorarten	35
4.3	Validierung der Expressionsmuster ausgewählter CSGs auf mRNA-Ebene .	36
4.4	Analyse der immunhistochemischen nukleären PAX7 Immunaktivität in Primärtumoren und Normalgeweben	37
4.5	Validierung der Expressionsmuster ausgewählter CSGs auf Proteinebene mittels Immunhistochemie	38
4.6	Affinitäten verschiedener Peptide zu MHC-I im T2-Peptidbindungsversuch	41
4.7	Titration T2-Peptidbindungsversuch	45

TABELLENVERZEICHNIS

3.1	Zugangs-Codes der verwendeten Microarrays [58]	11
3.2	Zelllinien [58]	16
3.3	Primer-Sequenzen [58]	18
3.4	Gewebearten im TMA [58]	19
3.5	Peptidsequenzen [58]	21
4.1	Peptidaffinitäten [58]	42

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] LOMBARD, M. ; PASTORET, P. P. ; MOULIN, A. M.: A brief history of vaccines and vaccination. In: *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 26 (2007), Apr, Nr. 1, S. 29–48
- [2] DECKER, W. K. ; SILVA, R. F. ; SANABRIA, M. H. ; ANGELO, L. S. ; GUIMARAES, F. ; BURT, B. M. ; KHERADMAND, F. ; PAUST, S.: Cancer Immunotherapy: Historical Perspective of a Clinical Revolution and Emerging Preclinical Animal Models. In: *Front Immunol* 8 (2017), S. 829
- [3] *Impfungen A-Z*. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/ImpfungenAZ/ImpfungenAZ_node.html, . – abgerufen am 3. Juli 2019
- [4] *Tuberkulose: BCG-Impfung schützt länger als angenommen.* =<https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/78029/Tuberkulose-BCG-Impfung-schuetzt-laenger-als-angenommen>, Sep 2017. – abgerufen am 3. Juli 2019
- [5] BAXTER, D.: Active and passive immunization for cancer. In: *Hum Vaccin Immunother* 10 (2014), Nr. 7, S. 2123–2129
- [6] HAMID, O. ; ROBERT, C. ; DAUD, A. ; HODI, F. S. ; HWU, W. J. ; KEFFORD, R. ; WOLCHOK, J. D. ; HERSEY, P. ; JOSEPH, R. W. ; WEBER, J. S. ; DRONCA, R. ; GANGADHAR, T. C. ; PATNAIK, A. ; ZAROOUR, H. ; JOSHUA, A. M. ; GERGICH, K. ; ELASSAÏSS-SCHAAP, J. ; ALGAZI, A. ; MATEUS, C. ; BOASBERG, P. ; TUMEH, P. C. ; CHMIELOWSKI, B. ; EBBINGHAUS, S. W. ; LI, X. N. ; KANG, S. P. ; RIBAS, A.: Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. In: *N. Engl. J. Med.* 369 (2013), Jul, Nr. 2, S. 134–144
- [7] ISAACS, A. ; LINDENMANN, J.: Virus interference. I. The interferon. In: *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 147 (1957), Sep, Nr. 927, S. 258–267
- [8] MILLER, J. F. ; MITCHELL, G. F. ; WEISS, N. S.: Cellular basis of the immunological defects in thymectomized mice. In: *Nature* 214 (1967), Jun, Nr. 5092, S. 992–997
- [9] STEINMAN, R. M. ; COHN, Z. A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. In: *J. Exp. Med.* 137 (1973), May, Nr. 5, S. 1142–1162

- [10] ZINKERNAGEL, R. M. ; DOHERTY, P. C.: Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. In: *Nature* 248 (1974), Apr, Nr. 5450, S. 701–702
- [11] KIESSLING, R. ; KLEIN, E. ; WIGZELL, H.: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. In: *Eur. J. Immunol.* 5 (1975), Feb, Nr. 2, S. 112–117
- [12] KIESSLING, R. ; KLEIN, E. ; PROSS, H. ; WIGZELL, H.: "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. In: *Eur. J. Immunol.* 5 (1975), Feb, Nr. 2, S. 117–121
- [13] *CRI history.* Website, . – Online erhältlich unter =<https://www.cancerresearch.org/about-cri/cri-history>; abgerufen am 06.10.2019.
- [14] GUBIN, M. M. ; ARTYOMOV, M. N. ; MARDIS, E. R. ; SCHREIBER, R. D.: Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. In: *J. Clin. Invest.* 125 (2015), Sep, Nr. 9, S. 3413–3421
- [15] BRUGGEN, P. van d. ; TRAVERSARI, C. ; CHOMEZ, P. ; LURQUIN, C. ; DE PLAEN, E. ; EYNDE, B. Van d. ; KNUTH, A. ; BOON, T.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. In: *Science* 254 (1991), Dec, Nr. 5038, S. 1643–1647
- [16] KAPLAN, D. H. ; SHANKARAN, V. ; DIGHE, A. S. ; STOCKERT, E. ; AGUET, M. ; OLD, L. J. ; SCHREIBER, R. D.: Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998), Jun, Nr. 13, S. 7556–7561
- [17] SHANKARAN, V. ; IKEDA, H. ; BRUCE, A. T. ; WHITE, J. M. ; SWANSON, P. E. ; OLD, L. J. ; SCHREIBER, R. D.: IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. In: *Nature* 410 (2001), Apr, Nr. 6832, S. 1107–1111
- [18] PARKER, K. H. ; BEURY, D. W. ; OSTRAND-ROSENBERG, S.: Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. In: *Adv. Cancer Res.* 128 (2015), S. 95–139
- [19] TANG, Y. ; XU, X. ; GUO, S. ; ZHANG, C. ; TANG, Y. ; TIAN, Y. ; NI, B. ; LU, B. ; WANG, H.: An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory T cells is correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *PLoS ONE* 9 (2014), Nr. 3, S. e91551

- [20] UGEL, S. ; DE SANCTIS, F. ; MANDRUZZATO, S. ; BRONTE, V.: Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. In: *J. Clin. Invest.* 125 (2015), Sep, Nr. 9, S. 3365–3376
- [21] LAVIN, Y. ; KOBAYASHI, S. ; LEADER, A. ; AMIR, E. D. ; ELEFANT, N. ; BIGENWALD, C. ; REMARK, R. ; SWEENEY, R. ; BECKER, C. D. ; LEVINE, J. H. ; MEINHOF, K. ; CHOW, A. ; KIM-SHULZE, S. ; WOLF, A. ; MEDAGLIA, C. ; LI, H. ; RYTLEWSKI, J. A. ; EMERSON, R. O. ; SOLOVYOV, A. ; GREENBAUM, B. D. ; SANDERS, C. ; VIGNALI, M. ; BEASLEY, M. B. ; FLORES, R. ; GNJATIC, S. ; PE'ER, D. ; RAHMAN, A. ; AMIT, I. ; MERAD, M.: Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. In: *Cell* 169 (2017), 05, Nr. 4, S. 750–765
- [22] PARDOLL, D.: Does the immune system see tumors as foreign or self? In: *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003), S. 807–839
- [23] HOGQUIST, K. A. ; BALDWIN, T. A. ; JAMESON, S. C.: Central tolerance: learning self-control in the thymus. In: *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005), Oct, Nr. 10, S. 772–782
- [24] STONE, J. D. ; HARRIS, D. T. ; KRANZ, D. M.: TCR affinity for p/MHC formed by tumor antigens that are self-proteins: impact on efficacy and toxicity. In: *Curr. Opin. Immunol.* 33 (2015), Apr, S. 16–22
- [25] SCANLAN, M. J. ; GURE, A. O. ; JUNGBLUTH, A. A. ; OLD, L. J. ; CHEN, Y. T.: Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. In: *Immunol. Rev.* 188 (2002), Oct, S. 22–32
- [26] MELERO, I. ; HERVAS-STUBBS, S. ; GLENNIE, M. ; PARDOLL, D. M. ; CHEN, L.: Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. In: *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007), Feb, Nr. 2, S. 95–106
- [27] HODI, F. S. ; O'DAY, S. J. ; MCDERMOTT, D. F. ; WEBER, R. W. ; SOSMAN, J. A. ; HAANEN, J. B. ; GONZALEZ, R. ; ROBERT, C. ; SCHADENDORF, D. ; HASSEL, J. C. ; AKERLEY, W. ; EERTWEGH, A. J. d. ; LUTZKY, J. ; LORIGAN, P. ; VAUBEL, J. M. ; LINETTE, G. P. ; HOGG, D. ; OTTENSMEIER, C. H. ; LEBBE, C. ; PESCHEL, C. ; QUIRT, I. ; CLARK, J. I. ; WOLCHOK, J. D. ; WEBER, J. S. ; TIAN, J. ; YELLIN, M. J. ; NICHOL, G. M. ; HOOS, A. ; URBA, W. J.: Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. In: *N. Engl. J. Med.* 363 (2010), Aug, Nr. 8, S. 711–723
- [28] KRUMMEL, M. F. ; ALLISON, J. P.: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. In: *J. Exp. Med.* 182 (1995), Aug, Nr. 2, S. 459–465
- [29] BLANK, C. ; BROWN, I. ; PETERSON, A. C. ; SPIOTTO, M. ; IWAI, Y. ; HONJO, T. ; GAJEWSKI, T. F.: PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by

- T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. In: *Cancer Res.* 64 (2004), Feb, Nr. 3, S. 1140–1145
- [30] BRAHMER, J. R. ; TYKODI, S. S. ; CHOW, L. Q. ; HWU, W. J. ; TOPALIAN, S. L. ; HWU, P. ; DRAKE, C. G. ; CAMACHO, L. H. ; KAUH, J. ; ODUNSI, K. ; PITOT, H. C. ; HAMID, O. ; BHATIA, S. ; MARTINS, R. ; EATON, K. ; CHEN, S. ; SALAY, T. M. ; ALAPARTHY, S. ; GROSSO, J. F. ; KORMAN, A. J. ; PARKER, S. M. ; AGRAWAL, S. ; GOLDBERG, S. M. ; PARDOLL, D. M. ; GUPTA, A. ; WIGGINTON, J. M.: Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 366 (2012), Jun, Nr. 26, S. 2455–2465
- [31] TOPALIAN, S. L. ; HODI, F. S. ; BRAHMER, J. R. ; GETTINGER, S. N. ; SMITH, D. C. ; MCDERMOTT, D. F. ; POWDERLY, J. D. ; CARVAJAL, R. D. ; SOSMAN, J. A. ; ATKINS, M. B. ; LEMING, P. D. ; SPIGEL, D. R. ; ANTONIA, S. J. ; HORN, L. ; DRAKE, C. G. ; PARDOLL, D. M. ; CHEN, L. ; SHARFMAN, W. H. ; ANDERS, R. A. ; TAUBE, J. M. ; MCMILLER, T. L. ; XU, H. ; KORMAN, A. J. ; JURE-KUNKEL, M. ; AGRAWAL, S. ; McDONALD, D. ; KOLLIA, G. D. ; GUPTA, A. ; WIGGINTON, J. M. ; SZNOL, M.: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 366 (2012), Jun, Nr. 26, S. 2443–2454
- [32] HEINZERLING, Lucie ; TONI, Enrico de ; SCHETT, Georg ; HUNDORFEAN, Gheorghe ; ZIMMER, Lisa: Checkpoint-Inhibitoren. In: *Dtsch Arztebl International* 116 (2019), Nr. 8, 119-126. <http://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2019.0119>. – DOI 10.3238/arztebl.2019.0119
- [33] TERME, M. ; COLUSSI, O. ; MARCHETEAU, E. ; TANCHOT, C. ; TARTOUR, E. ; TAIEB, J.: Modulation of immunity by antiangiogenic molecules in cancer. In: *Clin. Dev. Immunol.* 2012 (2012), S. 492920
- [34] EB: Oberflächliches Blasenkarzinom: Weniger Rezidive durch Mykobakterien. In: *Dtsch Arztebl International* 93 (1996), Nr. 47, A-3138-
- [35] ALHUNAIDI, O. ; ZLOTTA, A. R.: The use of intravesical BCG in urothelial carcinoma of the bladder. In: *Ecancermedicalscience* 13 (2019), S. 905
- [36] HERNANDEZ-LUNA, M. A. ; LURIA-PEREZ, R.: Cancer Immunotherapy: Priming the Host Immune Response with Live Attenuated *Salmonella enterica*. In: *J Immunol Res* 2018 (2018), S. 2984247
- [37] ESHHAR, Z. ; WAKS, T. ; GROSS, G. ; SCHINDLER, D. G.: Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993), Jan, Nr. 2, S. 720–724

- [38] WEI, J. ; HAN, X. ; BO, J. ; HAN, W.: Target selection for CAR-T therapy. In: *J Hematol Oncol* 12 (2019), Jun, Nr. 1, S. 62
- [39] PORTER, D. L. ; LEVINE, B. L. ; KALOS, M. ; BAGG, A. ; JUNE, C. H.: Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. In: *N. Engl. J. Med.* 365 (2011), Aug, Nr. 8, S. 725–733
- [40] GARFALL, A. L. ; MAUS, M. V. ; HWANG, W. T. ; LACEY, S. F. ; MAHNKE, Y. D. ; MELENHORST, J. J. ; ZHENG, Z. ; VOGL, D. T. ; COHEN, A. D. ; WEISS, B. M. ; DENGEL, K. ; KERR, N. D. ; BAGG, A. ; LEVINE, B. L. ; JUNE, C. H. ; STADTMAUER, E. A.: Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. In: *N. Engl. J. Med.* 373 (2015), Sep, Nr. 11, S. 1040–1047
- [41] GRUPP, S. A. ; KALOS, M. ; BARRETT, D. ; APLENC, R. ; PORTER, D. L. ; RHEINGOLD, S. R. ; TEACHEY, D. T. ; CHEW, A. ; HAUCK, B. ; WRIGHT, J. F. ; MILONE, M. C. ; LEVINE, B. L. ; JUNE, C. H.: Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. In: *N. Engl. J. Med.* 368 (2013), Apr, Nr. 16, S. 1509–1518
- [42] MAUDE, S. L. ; FREY, N. ; SHAW, P. A. ; APLENC, R. ; BARRETT, D. M. ; BUNIN, N. J. ; CHEW, A. ; GONZALEZ, V. E. ; ZHENG, Z. ; LACEY, S. F. ; MAHNKE, Y. D. ; MELENHORST, J. J. ; RHEINGOLD, S. R. ; SHEN, A. ; TEACHEY, D. T. ; LEVINE, B. L. ; JUNE, C. H. ; PORTER, D. L. ; GRUPP, S. A.: Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. In: *N. Engl. J. Med.* 371 (2014), Oct, Nr. 16, S. 1507–1517
- [43] ZHANG, T. ; CAO, L. ; XIE, J. ; SHI, N. ; ZHANG, Z. ; LUO, Z. ; YUE, D. ; ZHANG, Z. ; WANG, L. ; HAN, W. ; XU, Z. ; CHEN, H. ; ZHANG, Y.: Efficiency of CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for treatment of B cell malignancies in phase I clinical trials: a meta-analysis. In: *Oncotarget* 6 (2015), Oct, Nr. 32, S. 33961–33971
- [44] KREBSINFORMATIONSDIENST: *CAR-T-Zell-Therapien in Europa zugelassen.* Website, Aug 2018. – Online erhältlich unter <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2018/fk11-car-t-zell-therapie-krebs-zulassung.php>; abgerufen am 3. Juli 2019.
- [45] LO, A. ; WANG, L. S. ; SCHOLLER, J. ; MONSLOW, J. ; AVERY, D. ; NEWICK, K. ; O'BRIEN, S. ; EVANS, R. A. ; BAJOR, D. J. ; CLENDENIN, C. ; DURHAM, A. C. ; BUZA, E. L. ; VONDERHEIDE, R. H. ; JUNE, C. H. ; ALBELDA, S. M. ; PURE, E.: Tumor-Promoting Desmoplasia Is Disrupted by Depleting FAP-Expressing Stromal Cells. In: *Cancer Res.* 75 (2015), Jul, Nr. 14, S. 2800–2810
- [46] GULDEN, Josef: Fortgeschrittenes Mammakarzinom: Antikörper-Toxin-Konjugat ist hochwirksam. In: *Dtsch Arztebl International* 110 (2013), Nr. 6, A-224-A-224
- [47] DIAMANTIS, N. ; BANERJI, U.: Antibody-drug conjugates—an emerging class of cancer treatment. In: *Br. J. Cancer* 114 (2016), Feb, Nr. 4, S. 362–367

- [48] VETTER, Christine: Brentuximab Vedotin: Option für vorbehandelte Patienten. In: *Dtsch Arztebl International* 109 (2012), Nr. 20, A-1041-A-1041
- [49] KIRSCHNER, A. ; THIEDE, M. ; GRUNEWALD, T. G. ; ALBA RUBIO, R. ; RICHTER, G. H. ; KIRCHNER, T. ; BUSCH, D. H. ; BURDACH, S. ; THIEL, U.: Pappalysin-1 T cell receptor transgenic allo-restricted T cells kill Ewing sarcoma in vitro and in vivo. In: *Oncoimmunology* 6 (2017), Nr. 2, S. e1273301
- [50] LINETTE, G. P. ; STADTMAUER, E. A. ; MAUS, M. V. ; RAPOPORT, A. P. ; LEVINE, B. L. ; EMERY, L. ; LITZKY, L. ; BAGG, A. ; CARRENO, B. M. ; CIMINO, P. J. ; BINDER-SCHOLL, G. K. ; SMETHURST, D. P. ; GERRY, A. B. ; PUMPHREY, N. J. ; BENNETT, A. D. ; BREWER, J. E. ; DUKES, J. ; HARPER, J. ; TAYTON-MARTIN, H. K. ; JAKOBSEN, B. K. ; HASSAN, N. J. ; KALOS, M. ; JUNE, C. H.: Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. In: *Blood* 122 (2013), Aug, Nr. 6, S. 863–871
- [51] CAMERON, B. J. ; GERRY, A. B. ; DUKES, J. ; HARPER, J. V. ; KANNAN, V. ; BIANCHI, F. C. ; GRAND, F. ; BREWER, J. E. ; GUPTA, M. ; PLESA, G. ; BOSSI, G. ; VUIDEPOT, A. ; POWLESLAND, A. S. ; LEGG, A. ; ADAMS, K. J. ; BENNETT, A. D. ; PUMPHREY, N. J. ; WILLIAMS, D. D. ; BINDER-SCHOLL, G. ; KULIKOVSKAYA, I. ; LEVINE, B. L. ; RILEY, J. L. ; VARELA-ROHENA, A. ; STADTMAUER, E. A. ; RAPOPORT, A. P. ; LINETTE, G. P. ; JUNE, C. H. ; HASSAN, N. J. ; KALOS, M. ; JAKOBSEN, B. K.: Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. In: *Sci Transl Med* 5 (2013), Aug, Nr. 197, S. 197ra103
- [52] BLAESCHKE, F. ; THIEL, U. ; KIRSCHNER, A. ; THIEDE, M. ; ALBA RUBIO, R. ; SCHIRMER, D. ; KIRCHNER, T. ; RICHTER, G. H. S. ; MALL, S. ; KLAR, R. ; RIDDELL, S. ; BUSCH, D. H. ; KRACKHARDT, A. ; GRUNEWALD, T. G. P. ; BURDACH, S. E. G.: Human HLA-A*02:01/CHM1+ allo-restricted T cell receptor transgenic CD8+ T Cells specifically inhibit Ewing sarcoma growth in vitro and in vivo. In: *Oncotarget* 7 (2016), Nr. 28, S. 43267–43280
- [53] THIEL, U. ; SCHOBER, S. J. ; EINSPIELER, I. ; KIRSCHNER, A. ; THIEDE, M. ; SCHIRMER, D. ; GALL, K. ; BLAESCHKE, F. ; SCHMIDT, O. ; JABAR, S. ; RANFT, A. ; ALBA RUBIO, R. ; DIRKSEN, U. ; GRUNEWALD, T. G. P. ; SORENSEN, P. H. ; RICHTER, G. H. S. ; LUTTICHAU, I. T. ; BUSCH, D. H. ; BURDACH, S. E. G.: Ewing sarcoma partial regression without GvHD by chondromodulin-I/HLA-A*02:01-specific allorestricted T cell receptor transgenic T cells. In: *Oncoimmunology* 6 (2017), Nr. 5, S. e1312239
- [54] GEARY, S. M. ; SALEM, A. K.: Prostate cancer vaccines: Update on clinical development. In: *Oncoimmunology* 2 (2013), May, Nr. 5, S. e24523
- [55] LE, D. T. ; PARDOLL, D. M. ; JAFFEE, E. M.: Cellular vaccine approaches. In: *Cancer J* 16 (2010), Nr. 4, S. 304–310

- [56] SMALL, E. J. ; SACKS, N. ; NEMUNAITIS, J. ; URBA, W. J. ; DULA, E. ; CENTENO, A. S. ; NELSON, W. G. ; ANDO, D. ; HOWARD, C. ; BORELLINI, F. ; NGUYEN, M. ; HEGE, K. ; SIMONS, J. W.: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting allogeneic cellular immunotherapy for hormone-refractory prostate cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 13 (2007), Jul, Nr. 13, S. 3883–3891
- [57] ZYL, D. G. ; TSAI, M. H. ; SHUMILOV, A. ; SCHNEIDT, V. ; POIREY, R. ; SCHLEHE, B. ; FLUHR, H. ; MAUTNER, J. ; DELECLUSE, H. J.: Immunogenic particles with a broad antigenic spectrum stimulate cytolytic T cells and offer increased protection against EBV infection ex vivo and in mice. In: *PLoS Pathog.* 14 (2018), 12, Nr. 12, S. e1007464
- [58] BALDAUF, M. C. ; GERKE, J. S. ; KIRSCHNER, A. ; BLAESCHKE, F. ; EFFENBERGER, M. ; SCHOBER, K. ; RUBIO, R. A. ; KANASEKI, T. ; KIRAN, M. M. ; DALLMAYER, M. ; MUSA, J. ; AKPOLAT, N. ; AKATLI, A. N. ; ROSMAN, F. C. ; OZEN, O. ; SUGITA, S. ; HASEGAWA, T. ; SUGIMURA, H. ; BAUMHOER, D. ; KNOTT, M. M. L. ; SANNINO, G. ; MARCHETTO, A. ; LI, J. ; BUSCH, D. H. ; FEUCHTINGER, T. ; OHMURA, S. ; ORTH, M. F. ; THIEL, U. ; KIRCHNER, T. ; GRUNEWALD, T. G. P.: Systematic identification of cancer-specific MHC-binding peptides with RAVEN. In: *Oncoimmunology* 7 (2018), Nr. 9, S. e1481558
- [59] LAWRENCE, M. S. ; STOJANOV, P. ; POLAK, P. ; KRYUKOV, G. V. ; CIBULSKIS, K. ; SIVACHENKO, A. ; CARTER, S. L. ; STEWART, C. ; MERMEL, C. H. ; ROBERTS, S. A. ; KIEZUN, A. ; HAMMERMAN, P. S. ; MCKENNA, A. ; DRIER, Y. ; ZOU, L. ; RAMOS, A. H. ; PUGH, T. J. ; STRANSKY, N. ; HELMAN, E. ; KIM, J. ; SOUGNEZ, C. ; AMBROGIO, L. ; NICKERSON, E. ; SHEFLER, E. ; CORTES, M. L. ; AUCLAIR, D. ; SAKSENA, G. ; VOET, D. ; NOBLE, M. ; DiCARA, D. ; LIN, P. ; LICHTENSTEIN, L. ; HEIMAN, D. I. ; FENNELL, T. ; IMIELINSKI, M. ; HERNANDEZ, B. ; HODIS, E. ; BACA, S. ; DULAK, A. M. ; LOHR, J. ; LANDAU, D. A. ; WU, C. J. ; MELENDEZ-ZAJGLA, J. ; HIDALGO-MIRANDA, A. ; KOREN, A. ; MCCARROLL, S. A. ; MORA, J. ; CROMPTON, B. ; ONOFRIO, R. ; PARKIN, M. ; WINCKLER, W. ; ARDLIE, K. ; GABRIEL, S. B. ; ROBERTS, C. W. M. ; BIEGEL, J. A. ; STEGMAIER, K. ; BASS, A. J. ; GARRAWAY, L. A. ; MEYERSON, M. ; GOLUB, T. R. ; GORDENIN, D. A. ; SUNYAEV, S. ; LANDER, E. S. ; GETZ, G.: Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. In: *Nature* 499 (2013), Jul, Nr. 7457, S. 214–218
- [60] RUNG, J. ; BRAZMA, A.: Reuse of public genome-wide gene expression data. In: *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013), Feb, Nr. 2, S. 89–99
- [61] DAI, M. ; WANG, P. ; BOYD, A. D. ; KOSTOV, G. ; ATHEY, B. ; JONES, E. G. ; BUNNEY, W. E. ; MYERS, R. M. ; SPEED, T. P. ; AKIL, H. ; WATSON, S. J. ; MENG, F.: Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. In: *Nucleic Acids Res.* 33 (2005), Nov, Nr. 20, S. e175

- [62] KAWAKAMI, A. ; KIMURA-KAWAKAMI, M. ; NOMURA, T. ; FUJISAWA, H.: Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. In: *Mech. Dev.* 66 (1997), Aug, Nr. 1-2, S. 119–130
- [63] GOTCH, F. ; ROTHBARD, J. ; HOWLAND, K. ; TOWNSEND, A. ; MCMICHAEL, A.: Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2. In: *Nature* 326 (1987), Nr. 6116, S. 881–882
- [64] BRETTSCHEIDER, J. ; COLLIN, F. ; BOLSTAD, B. M. ; SPEED, T. P.: Quality assessment for short oligonucleotide microarray data. In: *ArXiv e-prints* (2007), September
- [65] BOLSTAD, B. M.: *affyPLM: Model Based QC Assessment of Affymetrix GeneChips*. <https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/affyPLM/inst/doc/QualityAssess.pdf>, october 2017. – abgerufen am 24.11.2017
- [66] BOLSTAD, B. M.: *RMAExpress Users Guide*. http://rmaexpress.bmbolstad.com/RMAExpress_UsersGuide.pdf, august 2014. – abgerufen am 24.11.2017
- [67] IRIZARRY, R. A. ; HOBBS, B. ; COLLIN, F. ; BEAZER-BARCLAY, Y. D. ; ANTONELLIS, K. J. ; SCHERF, U. ; SPEED, T. P.: Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. In: *Biostatistics* 4 (2003), Apr, Nr. 2, S. 249–264
- [68] XU, Q. W. ; ZHAO, W. ; WANG, Y. ; SARTOR, M. A. ; HAN, D. M. ; DENG, J. ; PONNALA, R. ; YANG, J. Y. ; ZHANG, Q. Y. ; LIAO, G. Q. ; QU, Y. M. ; LI, L. ; LIU, F. F. ; ZHAO, H. M. ; YIN, Y. H. ; CHEN, W. F. ; ZHANG, Y. ; WANG, X. S.: An integrated genome-wide approach to discover tumor-specific antigens as potential immunologic and clinical targets in cancer. In: *Cancer Res.* 72 (2012), Dec, Nr. 24, S. 6351–6361
- [69] KADOTA, K. ; YE, J. ; NAKAI, Y. ; TERADA, T. ; SHIMIZU, K.: ROKU: a novel method for identification of tissue-specific genes. In: *BMC Bioinformatics* 7 (2006), Jun, S. 294
- [70] MARTIN, J. L.: Validation of Reference Genes for Oral Cancer Detection Panels in a Prospective Blinded Cohort. In: *PLoS ONE* 11 (2016), Nr. 7, S. e0158462
- [71] LIVAK, K. J. ; SCHMITTGEN, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods* 25 (2001), Dec, Nr. 4, S. 402–408
- [72] REMMELE, W. ; STEGNER, H. E.: [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. In: *Pathologie* 8 (1987), May, Nr. 3, S. 138–140

- [73] ANDREATTA, M. ; NIELSEN, M.: Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. In: *Bioinformatics* 32 (2016), Feb, Nr. 4, S. 511–517
- [74] BASSANI-STERMBERG, M. ; PLETSCHER-FRANKILD, S. ; JENSEN, L. J. ; MANN, M.: Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. In: *Mol. Cell Proteomics* 14 (2015), Mar, Nr. 3, S. 658–673
- [75] EICHMANN, M. ; RU, A. de ; VEELEN, P. A. ; PEAKMAN, M. ; KRONENBERG-VERSTEEG, D.: Identification and characterisation of peptide binding motifs of six autoimmune disease-associated human leukocyte antigen-class I molecules including HLA-B*39:06. In: *Tissue Antigens* 84 (2014), Oct, Nr. 4, S. 378–388
- [76] LUNDEGAARD, C. ; LUND, O. ; NIELSEN, M.: Accurate approximation method for prediction of class I MHC affinities for peptides of length 8, 10 and 11 using prediction tools trained on 9mers. In: *Bioinformatics* 24 (2008), Jun, Nr. 11, S. 1397–1398
- [77] GRAGERT, L. ; MADBOULY, A. ; FREEMAN, J. ; MAIERS, M.: Six-locus high resolution HLA haplotype frequencies derived from mixed-resolution DNA typing for the entire US donor registry. In: *Hum. Immunol.* 74 (2013), Oct, Nr. 10, S. 1313–1320
- [78] GONZALEZ-GALARZA, F. F. ; TAKESHITA, L. Y. ; SANTOS, E. J. ; KEMPSON, F. ; MAIA, M. H. ; SILVA, A. L. ; SILVA, A. L. e. ; GHATTAORAYA, G. S. ; ALFIREVIC, A. ; JONES, A. R. ; MIDDLETON, D.: Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. In: *Nucleic Acids Res.* 43 (2015), Jan, Nr. Database issue, S. D784–788
- [79] KIM, Y. ; SIDNEY, J. ; PINILLA, C. ; SETTE, A. ; PETERS, B.: Derivation of an amino acid similarity matrix for peptide: MHC binding and its application as a Bayesian prior. In: *BMC Bioinformatics* 10 (2009), Nov, S. 394
- [80] WANG, Y. ; ZHOU, P. ; LIN, Y. ; SHU, M. ; HU, Y. ; XIA, Q. ; LIN, Z.: Quantitative prediction of class I MHC/epitope binding affinity using QSAR modeling derived from amino acid structural information. In: *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 18 (2015), Nr. 1, S. 75–82
- [81] HOOF, I. ; PETERS, B. ; SIDNEY, J. ; PEDERSEN, L. E. ; SETTE, A. ; LUND, O. ; BUUS, S. ; NIELSEN, M.: NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. In: *Immunogenetics* 61 (2009), Jan, Nr. 1, S. 1–13
- [82] KOCH, C. P. ; PERNA, A. M. ; PILLONG, M. ; TODOROFF, N. K. ; WREDE, P. ; FOLKERS, G. ; HISS, J. A. ; SCHNEIDER, G.: Scrutinizing MHC-I binding peptides and their limits of variation. In: *PLoS Comput. Biol.* 9 (2013), Nr. 6, S. e1003088

- [83] KUKSA, P. P. ; MIN, M. R. ; DUGAR, R. ; GERSTEIN, M.: High-order neural networks and kernel methods for peptide-MHC binding prediction. In: *Bioinformatics* 31 (2015), Nov, Nr. 22, S. 3600–3607
- [84] NIELSEN, M. ; LUNDEGAARD, C. ; WORNING, P. ; LAUEMOLLER, S. L. ; LAMBERTH, K. ; BUUS, S. ; BRUNAK, S. ; LUND, O.: Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. In: *Protein Sci.* 12 (2003), May, Nr. 5, S. 1007–1017
- [85] NIELSEN, M. ; LUNDEGAARD, C. ; WORNING, P. ; HVID, C. S. ; LAMBERTH, K. ; BUUS, S. ; BRUNAK, S. ; LUND, O.: Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. In: *Bioinformatics* 20 (2004), Jun, Nr. 9, S. 1388–1397
- [86] LUNDEGAARD, C. ; LAMBERTH, K. ; HARND AHL, M. ; BUUS, S. ; LUND, O. ; NIELSEN, M.: NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. In: *Nucleic Acids Res.* 36 (2008), Jul, Nr. Web Server issue, S. W509–512
- [87] KIRSCHNER, A. ; THIEDE, M. ; BLAESCHKE, F. ; RICHTER, G. H. ; GERKE, J. S. ; BALDAUF, M. C. ; GRUNEWALD, T. G. ; BUSCH, D. H. ; BURDACH, S. ; THIEL, U.: Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 predicts fratricide amongst T cell receptor transgenic CD8+ T cells directed against tumor-associated antigens. In: *Oncotarget* 7 (2016), Aug, Nr. 35, S. 56584–56597
- [88] LEISEGANG, M. ; WILDE, S. ; SPRANGER, S. ; MILOSEVIC, S. ; FRANKENBERGER, B. ; UCKERT, W. ; SCHENDEL, D. J.: MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing survivin-specific transgenic T cell receptors. In: *J. Clin. Invest.* 120 (2010), Nov, Nr. 11, S. 3869–3877
- [89] WU, B.: Cancer outlier differential gene expression detection. In: *Biostatistics* 8 (2007), Jul, Nr. 3, S. 566–575
- [90] SIMPSON, A. J. ; CABALLERO, O. L. ; JUNGBLUTH, A. ; CHEN, Y. T. ; OLD, L. J.: Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. In: *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005), Aug, Nr. 8, S. 615–625
- [91] COULIE, P. G. ; EYNDE, B. J. d. ; BRUGGEN, P. van d. ; BOON, T.: Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. In: *Nat. Rev. Cancer* 14 (2014), Feb, Nr. 2, S. 135–146
- [92] FOELL, J. L. ; HESSE, M. ; VOLKMER, I. ; SCHMIEDEL, B. J. ; NEUMANN, I. ; STAEGE, M. S.: Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) Is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen. In: *Pediatr Blood Cancer* 51 (2008), Aug, Nr. 2, S. 228–234

- [93] OBERTHUER, A. ; HERO, B. ; SPITZ, R. ; BERTHOLD, F. ; FISCHER, M.: The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. In: *Clin. Cancer Res.* 10 (2004), Jul, Nr. 13, S. 4307–4313
- [94] SPEL, L. ; BOELEN, J. J. ; STEEN, D. M. d. ; BLOKLAND, N. J. ; NOESEL, M. M. ; MOLENAAR, J. J. ; HEEMSKERK, M. H. ; BOES, M. ; NIERKENS, S.: Natural killer cells facilitate PRAME-specific T-cell reactivity against neuroblastoma. In: *Oncotarget* 6 (2015), Nov, Nr. 34, S. 35770–35781
- [95] HARA, I. ; HARA, S. ; MIYAKE, H. ; YAMANAKA, K. ; NAGAI, H. ; GOHJI, K. ; ARAKAWA, S. ; KAMIDONO, S.: Expression of MAGE genes in testicular germ cell tumors. In: *Urology* 53 (1999), Apr, Nr. 4, S. 843–847
- [96] SOLING, A. ; SCHURR, P. ; BERTHOLD, F.: Expression and clinical relevance of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in neuroblastoma. In: *Anticancer Res.* 19 (1999), Nr. 3B, S. 2205–2209
- [97] IURA, K. ; MAEKAWA, A. ; KOHASHI, K. ; ISHII, T. ; BEKKI, H. ; OTSUKA, H. ; YAMADA, Y. ; YAMAMOTO, H. ; HARIMAYA, K. ; IWAMOTO, Y. ; ODA, Y.: Cancer-testis antigen expression in synovial sarcoma: NY-ESO-1, PRAME, MAGEA4, and MAGEA1. In: *Hum. Pathol.* 61 (2017), Mar, S. 130–139
- [98] HUDOLIN, T. ; KASTELAN, Z. ; ILIC, I. ; LEVARDA-HUDOLIN, K. ; BASIC-JUKIC, N. ; RIEKEN, M. ; SPAGNOLI, G. C. ; JURETIC, A. ; MENGUS, C.: Immunohistochemical analysis of the expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in diffuse large B-cell testicular lymphoma. In: *J Transl Med* 11 (2013), May, S. 123
- [99] SUDO, T. ; KURAMOTO, T. ; KOMIYA, S. ; INOUE, A. ; ITOH, K.: Expression of MAGE genes in osteosarcoma. In: *J. Orthop. Res.* 15 (1997), Jan, Nr. 1, S. 128–132
- [100] CHARVILLE, G. W. ; VARMA, S. ; FORGO, E. ; DUMONT, S. N. ; ZAMBRANO, E. ; TRENT, J. C. ; LAZAR, A. J. ; RIJN, M. van d.: PAX7 Expression in Rhabdomyosarcoma, Related Soft Tissue Tumors, and Small Round Blue Cell Neoplasms. In: *Am. J. Surg. Pathol.* 40 (2016), 10, Nr. 10, S. 1305–1315
- [101] GUBIN, M. M. ; ZHANG, X. ; SCHUSTER, H. ; CARON, E. ; WARD, J. P. ; NOGUCHI, T. ; IVANOVA, Y. ; HUNDAL, J. ; ARTHUR, C. D. ; KREBBER, W. J. ; MULDER, G. E. ; TOEBES, M. ; VESELY, M. D. ; LAM, S. S. ; KORMAN, A. J. ; ALLISON, J. P. ; FREEMAN, G. J. ; SHARPE, A. H. ; PEARCE, E. L. ; SCHUMACHER, T. N. ; AEBERSOLD, R. ; RAMMENSEE, H. G. ; MELIEF, C. J. ; MARDIS, E. R. ; GILLANDERS, W. E. ; ARTYOMOV, M. N. ; SCHREIBER, R. D.: Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. In: *Nature* 515 (2014), Nov, Nr. 7528, S. 577–581

- [102] ROBBINS, P. F. ; LU, Y. C. ; EL-GAMIL, M. ; LI, Y. F. ; GROSS, C. ; GARTNER, J. ; LIN, J. C. ; TEER, J. K. ; CLIFTEN, P. ; TYCKSEN, E. ; SAMUELS, Y. ; ROSENBERG, S. A.: Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. In: *Nat. Med.* 19 (2013), Jun, Nr. 6, S. 747–752
- [103] YADAV, M. ; JHUNJHUNWALA, S. ; PHUNG, Q. T. ; LUPARDUS, P. ; TANGUAY, J. ; BUMBACA, S. ; FRANCI, C. ; CHEUNG, T. K. ; FRITSCHKE, J. ; WEINSCHENK, T. ; MODRUSAN, Z. ; MELLMAN, I. ; LILL, J. R. ; DELAMARRE, L.: Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. In: *Nature* 515 (2014), Nov, Nr. 7528, S. 572–576
- [104] CHEN, C. ; LI, Z. ; HUANG, H. ; SUZEK, B. E. ; WU, C. H.: A fast Peptide Match service for UniProt Knowledgebase. In: *Bioinformatics* 29 (2013), Nov, Nr. 21, S. 2808–2809
- [105] ALMEIDA, L. G. ; SAKABE, N. J. ; DEOLIVEIRA, A. R. ; SILVA, M. C. ; MUNDSTEIN, A. S. ; COHEN, T. ; CHEN, Y. T. ; CHUA, R. ; GURUNG, S. ; GNJATIC, S. ; JUNGBLUTH, A. A. ; CABALLERO, O. L. ; BAIRCH, A. ; KIESLER, E. ; WHITE, S. L. ; SIMPSON, A. J. ; OLD, L. J. ; CAMARGO, A. A. ; VASCONCELOS, A. T.: CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. In: *Nucleic Acids Res.* 37 (2009), Jan, Nr. Database issue, S. D816–819
- [106] OUSTANINA, S. ; HAUSE, G. ; BRAUN, T.: Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. In: *EMBO J.* 23 (2004), Aug, Nr. 16, S. 3430–3439
- [107] BARR, F. G.: The role of chimeric paired box transcription factors in the pathogenesis of pediatric rhabdomyosarcoma. In: *Cancer Res.* 59 (1999), Apr, Nr. 7 Suppl, S. 1711s–1715s
- [108] JAHN, L. ; STEEN, D. M. d. ; HAGEDOORN, R. S. ; HOMBRINK, P. ; KESTER, M. G. ; SCHOONAKKER, M. P. ; RIDDER, D. de ; VEELLEN, P. A. ; FALKENBURG, J. H. ; HEEMSKERK, M. H.: Generation of CD20-specific TCRs for TCR gene therapy of CD20^{low} B-cell malignancies insusceptible to CD20-targeting antibodies. In: *Oncotarget* 7 (2016), Nov, Nr. 47, S. 77021–77037
- [109] DOSSA, R. G. ; CUNNINGHAM, T. ; SOMMERMEYER, D. ; MEDINA-RODRIGUEZ, I. ; BIERNACKI, M. A. ; FOSTER, K. ; BLEAKLEY, M.: Development of T-cell immunotherapy for hematopoietic stem cell transplantation recipients at risk of leukemia relapse. In: *Blood* 131 (2018), 01, Nr. 1, S. 108–120
- [110] LOCKE, F. L. ; ANASETTI, C.: Off-the-shelf TCR for graft-versus-leukemia without GVHD. In: *Blood* 131 (2018), 01, Nr. 1, S. 5–7

-
- [111] CHEN, F. ; LIU, C. ; ZHANG, J. ; XU, W. ; ZHANG, Y.: Progress of CDK4/6 Inhibitor Palbociclib in the Treatment of Cancer. In: *Anticancer Agents Med Chem* 18 (2018), Nr. 9, S. 1241–1251
- [112] HAGEL, M. ; MIDUTURU, C. ; SHEETS, M. ; RUBIN, N. ; WENG, W. ; STRANSKY, N. ; BIFULCO, N. ; KIM, J. L. ; HODOUS, B. ; BROOIJMANS, N. ; SHUTES, A. ; WINTER, C. ; LENGAUER, C. ; KOHL, N. E. ; GUZI, T.: First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas with an Activated FGFR4 Signaling Pathway. In: *Cancer Discov* 5 (2015), Apr, Nr. 4, S. 424–437
- [113] MATZIARI, M. ; DIVE, V. ; YIOTAKIS, A.: Matrix metalloproteinase 11 (MMP-11; stromelysin-3) and synthetic inhibitors. In: *Med Res Rev* 27 (2007), Jul, Nr. 4, S. 528–552

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich auf dem Weg zu dieser Doktorarbeit in irgendeiner Form begleitet und unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt hier natürlich meinem Doktorvater und engagierten Betreuer PD Dr. Dr. Thomas Grünewald, der bei Fragen immer ein offenes Ohr hatte und ohne dessen Hilfe das ganze Projekt und damit auch diese Arbeit nie zustande gekommen wären. Durch seine stete Förderung konnte ich einen großen Einblick in die Forschung erhalten, um den ich sehr dankbar bin.

Ebenfalls ein großer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Kirchner, der diese Arbeit mitbetreut hat und als Institutsleiter durch Feedback und auch durch das Bereitstellen der Labore und der technischen Einrichtung sowie durch Förderung von Kongressteilnahmen maßgeblich am Erfolg dieses Projektes beteiligt war.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Thomas Knösel für Hilfestellungen zur Erstellung der TMAs sowie Mona Melz für die Erstellung der TMAs danken. Ebenfalls danke ich Andrea Sendelhofert und Anja Heier für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Ein besonderes Dankeschön gilt unseren Kooperationspartnern, die viel Mühe und Zeit in weiterführenden Versuche investiert haben. Danke an PD Dr. Uwe Thiel, Dr. Andreas Kirschner, Prof. Dr. Dirk Busch, Dr. Kilian Schober, Manuel Effenberger, Dr. Franziska Blaeschke, Prof. Dr. Tobias Feuchtinger, Prof. Dr. Daniel Baumhoer, Prof. Dr. Dr. Takayuki Kanaseki, Prof. Dr. Nusret Akpolat, Prof. Dr. Ayse Nur Akatli, Prof. Dr. Fernando C. Rosman, Prof. Dr. Özlem Özen, Prof. Dr. Dr. Shintaro Sugita, Prof. Dr. Dr. Tadashi Hasegawa und Prof. Dr. Dr. Haruhiko Sugimura.

Allen meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Grünewald gilt natürlich ebenfalls ein ganz besonderer Dank, insbesondere Julia Gerke, die die Programmierung von RAVEN übernommen hat, Marlene Dallmayer, Rebeca Alba Rubio, Dr. Martin Orth, Julian Musa, Dr. Maximilian Knott, Merve Kiran, Jing Li, Dr. Shunya Ohmura, Aruna Marchetto und Dr. Giuseppina Sannino. Vielen Dank für die Zusammenarbeit, die gegenseitigen Hilfestellungen und auch für die vielen lustigen Momente.

Zudem möchte ich noch Prof. Dr. Andreas Jung und seiner Arbeitsgruppe sowie PD Dr. Steffen Ormanns ganz herzlich danken für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Hilfe im gemeinsamen Labor.

Ein weiteres Dankeschön geht an die Studienstiftung des deutschen Volkes, die die Teilnahme an zwei Kongressreisen für mich finanziert hat und damit diese Doktorarbeit bereichert hat.

Zuguterletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und Freunden außerhalb des Labors, die mir immer den Rücken gestärkt haben und mich motiviert haben. Vielen Dank Mama, Papa, Tobi, Julia, Babsi, Daniela, Kathi, Sebastian, Patricia, Jörg, Betti, Adrian, Aimo, Moritz, Jani, Domi, Niko.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

”Identifizierung neuer Zielstrukturen für eine Immuntherapie von Sarkomen”

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 19.06.2021

Michaela Baldauf

